

UNIVERSITE DE BLIDA1
Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

En sciences vétérinaires

Spécialité : Épidémiologie appliquée à la santé animale

**ENQUÊTE ÉPIDÉMIOLOGIQUE SUR LA
COLIBACILLOSE AVIAIRE DANS LA RÉGION
CENTRE D'ALGÉRIE**

Par

Mohamed LOUNIS

Devant le jury composé de :

N. MENOUEI	Professeur, Université de Blida1	Président
N. SAHRAOUI	Professeur, Université de Blida1	Examinatrice
D. KHELLEF	Professeur, ENSV Alger	Examineur
K. OUMOUNA	Professeur, Univ. Yahia. Fares de Médéa	Promotrice
M. OUMOUNA	Professeur, Univ. Yahia. Fares de Médéa	Co-promoteur

Blida, Décembre 2018

RÉSUMÉ

La colibacillose causée par les APEC (*Escherichia coli* pathogène aviaire) est l'une des infections bactériennes les plus fréquentes en pathologie aviaire.

Une enquête a été réalisée auprès de 15 vétérinaires praticiens répartis dans 4 wilayates d'Algérie (Bouira, Boumerdes, M'sila et Tizi Ouzou). Les poulets présentant des signes présumés de colibacilloses ont été signalés et les organes (cœur, foie, poumon) présentant des lésions caractéristiques ont été prélevés pour des études microbiologiques et histopathologiques. Des prélèvements de matières fécales d'animaux cliniquement sains ont été également inclus afin de comparer les résultats.

L'étude histopathologiques a confirmé la présence de certaines lésions caractéristiques de la colibacillose dont les principales sont des hépatites et des péricardites fibrineuses, des infiltrations leucocytaires, des congestions vasculaires, des dégénérescences vacuolaires et des œdèmes perivasculaires et péribronchioliques.

L'étude microbiologique a permis d'identifier 92 APEC et 32 AFEC (Avian Fécal *E. coli*). Ces souches ont été analysées par deux types de PCR pour la présence de 11 facteurs de virulence décrits comme spécifiques des APEC (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA* et *fimC*) ou des *E. coli* diarrhéiques (*eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH* et *aggR*). La sensibilité vis-à-vis de 16 antibiotiques a été testée.

Les résultats ont montré que 98% des souches testées possèdent au moins un seul facteur de virulence. Les gènes les plus fréquents chez les APEC sont *iutA* (90,6%), *ompT* (86,9%) et *iss* (85,8%) alors qu'*iutA* (78,1%), *fimC* (78,1%) et *iroN* (68,7%) sont les plus fréquents chez les AFEC.

Pour les facteurs des *E. coli* diarrhéiques, les résultats montrent qu'aucune souche AFEC n'est positive à ces gènes. De plus, 5,4%, 2,1% et 2,1% des APEC sont positives pour les gènes *elt/est*, *stx* et *ipaH*.

Concernant l'antibiorésistance, il s'avère que les taux de résistance les plus élevés ont été obtenus pour les antibiotiques les plus utilisés dans les élevages de volaille comme l'ampicilline, la tétracycline, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, le sulfisoxazole, la doxycycline, l'enrofloxacin, l'ofloxacin et la spectinomycine.

En général, Nos résultats apporte un éclairage nouveau sur le pouvoir virulent des APEC et des AFEC en Algérie ce qui pourrait participer à la lutte contre la colibacillose.

Mots clés: *E. coli*, APEC, AFEC, colibacillose aviaire, facteurs de virulence, antibiorésistance, lésions histopathologiques, Algérie.

ملخص

داء العصيات القولونية (الكوليباسيلوز) الناجمة عن APEC (إيشيريشيا كولي المسببة للمرض عند الطيور) هي واحدة من الالتهابات البكتيرية الأكثر شيوعا عند الطيور.

أجريت دراسة استقصائية شملت 15 بيطريا في 4 ولايات في الجزائر (البويرة، بومرداس، المسيلة وتيزي وزو). أبلغ عن الدجاج الذي أظهر علامات داء العصيات القولونية وأخذت عينات في الأعضاء (القلب، الكبد، الرئة) التي أظهرت آفات مميزة لإجراء دراسات ميكروبيولوجية و نسيجية. شملت الدراسة لذلك عينات لبراز الحيوانات الصحية سريريا لمقارنة النتائج.

تم تحليل ما مجموعه 92 APEC و 32 AFEC (إيشيريشيا كولي البراز عند الطيور) بواسطة نوعين من PCR بغرض البحث عن 11 عامل فوعة خاص بال APEC (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA*, *fimC*) و الإيشيريشيا كولي المعوية (*eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH*, *aggR*) كما تم اختبار الحساسية ضد 16 مضادا حيويا.

أظهرت النتائج أن 98% من السلالات التي تم اختبارها لها عامل فوعة واحد على الأقل . الجينات الأكثر شيوعا عند ال APEC هي *iutA* (90,6%) , *ompT* (86,9%) و *iss* (85,8%) بينما *iutA* (78,1%) , *fimC* (78,1%) و *iroN* (68,7%) هي الأكثر شيوعا عند ال AFEC.

بالنسبة لعوامل الإيشيريشيا كولي المعوية، أظهرت النتائج عدم وجود أي سلالة AFEC إيجابية لهذه الجينات. بالإضافة إلى ذلك 4,5%، 2,1% و 2,1% من ال APEC كانت إيجابية للجينات *ipaH*, *stx*, *elt/est*. أما فيما يتعلق بالمقاومة للمضادات الحيوية، فقد تبين أن أعلى معدلات المقاومة تم الحصول عليها عند المضادات الحيوية الأكثر استخداماً في مزارع الدواجن مثل الأمبسلين، التتراسيكلين، التريميثوبريم-سلفاميثوكسازول، السلفيسوكساسول، الدوكسيسيكليين، الأنروفلوكساسين، الأوفلوكساسين والسبكتينومييسين.

أخيرا أكدت الدراسة النسيجية المرضية وجود بعض الآفات المميزة لداء العصيات القولونية منها التهاب الكبد والتهاب القلب الفبريني , تسلل خلايا الدم البيضاء, احتقان الأوعية الدموية، تنكس فجوي ووذمات محيطة بالأوعية و القصيبات الهوائية.

بصفة عامة، سلطت نتائجنا الضوء على القدرة الفوعية لل APEC و ال AFEC في الجزائر والتي يمكن أن تساهم في مكافحة الكوليباسيلوز.

كلمات البحث: إيشيريشيا كولي، داء العصيات القولونية عند الطيور، APEC، AFEC، عوامل الفوعة، مقاومة المضادات الحيوية، الآفات النسيجية، الجزائر.

ABSTRACT

Colibacillosis caused by APEC (Avian pathogenic *Escherichia coli*) is one of the most frequent bacterial diseases in poultry.

A survey was done including 15 veterinary practitioners located in four departments of Algeria (Tizi Ouzou, Bouira, Boumerdes and M'sila).

Broilers with presumed signs of colibacillosis were signaled and organs (heart, liver, Lung) with characteristic lesions were sampled for microbiological and histopathological studies. Samples from feces of apparently healthy broilers were also included for comparison.

Histopathological analysis confirmed the presence of some typical colibacillosis lesions such as fibrinous hepatitis and pericarditis, leucocyte infiltrations, vascular congestions, vacuolar degenerations and perivascular and peribronchiolar oedema.

Microbiological analysis has identified 92 APEC and 32 AFEC. These strains were investigated by 2 types of PCRs for the presence of a total of 11 virulence-associated genes described for avian pathogenic (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA*, and *fimC*) and diarrheagenic *E. coli* (*eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH*, and *aggR*). The sensitivity to 16 antibiotics was also determined.

Results showed that 98% of the examined isolates host at least one of the tested virulence factors. The most prevalent genes in APEC were *iutA* (90.6%), *ompT* (86.9%) and *iss* (85.8%); whereas *iutA* (78.1%), *fimC* (78.1%) and *iroN* (68.7%) were the most prevalent in AFEC.

Regarding the *E. coli* diarrheagenic specific genes, our data showed that none of the AFEC isolates harbored any of them. Moreover, only 5.4%, 2.1% and 2.1% of APEC isolates were positives for *elt/est*, *stx* and *ipaH* genes.

We further established that the highest rates of resistance were obtained for the most used antibiotics in poultry breedings like ampicillin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, sulfisoxazole, doxycycline, enrofloxacin, ofloxacin and spectinomycin.

Overall, our findings provide more insights about APEC and AFEC virulence potential in Algeria which could participate in the fight against colibacillosis.

Keywords : *E. coli*, APEC, AFEC, Avian colibacillosis, Virulence factors, Antibiotic resistance, Histopathological lesions, Algeria

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury.

À Madame OUMOUNA K

Professeur à l'Université Yahia Fares de Médéa, qui m'a aidé tout au long de la réalisation de ce travail. Très sincères remerciements.

À Monsieur OUMOUNA M

Professeur à l'Université Yahia Fares de Médéa, pour ces conseils et son soutien, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères reconnaissances.

À tous les vétérinaires qui nous ont aidé dans la réalisation de ce travail.

À la directrice du Laboratoire d'hygiène intercommunal ainsi que le secrétaire général de l'APC de Draa El Mizan qui m'ont autorisé d'accéder au laboratoire et à tout le personnel.

Au professeur Junwei WANG qui nous a ouvert les portes de son laboratoire et à tout le personnel du Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Animal Products, China Animal Health and Epidemiology Center (CAHEC), Qingdao, Chine, qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements et ma reconnaissance.
MERCI

A monsieur KADDOUR R qui nous a permis de réaliser les analyses histopathologiques.

Nous tenons à remercier enfin, tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

À mes parents pour leur soutien, amour et patience durant ces longues années d'études, qu'ils trouvent ici un modeste témoignage de tout l'amour que j'ai pour eux,

À mes chers frères et sœurs.

À toute ma famille sans exception.

À tou(te)s mes ami(e)s.

À ma femme pour son amour, son aide, sa présence et sa patience.

TABLES DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	11
INTRODUCTION.....	12
1. LA COLIBACILLOSE AVIAIRE	14
1.1. Définition	14
1.2. Importance	14
1.3. Étude clinique et lésionnelle.....	15
1.3.1. Incubation.....	15
1.3.2. Formes cliniques	15
1.3.2.1. Forme septicémique ou colisepticémie	15
1.3.2.2. Forme respiratoire	16
1.3.2.3. Omphalites	16
1.3.2.4. Syndrome de la grosse tête	17
1.3.2.5. Coligranulomatose (Hjarres's disease).....	18
1.3.2.6. Ovarites et salpingites	18
1.3.2.7. Dermatites- cellulite	19
1.3.2.8. Entérite.....	19
1.3.2.9. Arthrites et synovites	20
2. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	21
2.1. Historique	21
2.2. Généralités.....	21
2.3. Principaux pathotypes d' <i>E. coli</i>	22
2.3.1. <i>E. coli</i> intestinales	23
2.3.1.1. <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC)	23
2.3.1.2. <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	24
2.3.1.3. <i>E. coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	24
2.3.1.4. <i>E. coli</i> entéro-agrégatives (EAggEC, ou EAEC).....	25

2.3.1.5. <i>E. coli</i> entéro-invasives (EIEC).....	25
2.3.2. <i>E. coli</i> pathogènes extraintestinales (ExPEC)	26
2.3.2.1. <i>E. coli</i> pathogènes aviaires (APEC)	27
2.4. Sérogroupes des <i>E. coli</i>	28
2.5. Groupes phylogénétiques des <i>E. coli</i>	28
3. FACTEURS DE VIRULENCE DES APEC	30
3.1. Les capsules	31
3.2. Les adhésines	31
3.2.1. Les fimbriae de type 1	32
3.2.2. Les fimbriae P	32
3.2.3. Les curli.....	34
3.3. Les protéines de la membrane externe OMP	35
3.3.1. iss «increased serum survival »	35
3.3.2. TraT	36
3.3.3. OmpT	37
3.4. L'hémagglutinine thermosensible (Tsh)	37
3.5. Les systèmes d'acquisition du fer (IROMPs)	38
3.6. Les toxines	39
3.6.1. L'hémolysine alpha	40
3.7. Utilisation des facteurs de virulence comme outil de diagnostic chez les APEC	41
4. RÉSISTANCE DES APEC AUX ANTIBIOTIQUES	43
4.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	43
4.1.1. Résistance aux β -lactamines	43
4.1.2. Résistance aux tétracyclines	45
4.1.3. Résistance aux aminosides.....	45
4.1.4. Résistance au triméthoprim/sulfaméthoxazole (TMP-SMX)	46
4.1.5. Résistance aux fluoroquinolones	47
4.1.6. Résistance à la colistine.....	49
5. PARTIE EXPÉRIMENTALE	53
5.1. Problématique	53
5.2. Objectifs	54
5.3. Matériel et méthodes.....	54
5.3.1. Matériel	54

5.3.2. Méthodes	54
5.3.2.1. Méthodologie et région d'étude	54
5.3.2.2. Autopsie	54
5.3.2.3. Prélèvement des organes	55
5.3.2.4. Prélèvement de fèces.....	55
5.3.2.5. Examen bactériologique	55
5.3.2.5.1. Identification à l'aide des galeries Api 20E	56
5.3.2.5.1.1. Principe	56
5.3.2.5.1.2. Mode opératoire	56
5.3.2.6. Étude histologique	57
5.3.2.6.1. Fixation.....	57
5.3.2.6.2. Inclusion en paraffine	57
5.3.2.6.3. Post fixation (rinçage)	57
5.3.2.6.4. Coupes histologiques	58
5.3.2.6.5. Coloration	58
5.3.2.7. Recherche des gènes de virulence	59
5.3.2.7.1. Extraction de l'ADN bactérien.....	59
5.3.2.7.2. Mise au point de la réaction PCR	59
5.3.2.7.2.1. Recherche des gènes spécifiques des APEC	59
5.3.2.7.2.2. Recherche des gènes des <i>E. coli</i> diarrhéiques	60
5.3.2.7.3. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	61
5.3.2.7.3.1. Protocole de préparation du gel d'agarose.....	61
5.3.2.7.3.2. Électrophorèse des produits d'amplification	62
5.3.2.8. Recherche de la résistance aux antibiotiques	62
5.3.2.9. Étude statistique.....	63
5.4. Résultats	63
5.4.1. Résultats histologiques	64
5.4.1. Prévalence des gènes de virulence spécifiques des APEC	67
5.4.1.1. Association des gènes de virulence	71
5.4.2. Prévalence des facteurs diarrhéiques des <i>E. coli</i>	72
5.4.3. Résultats de l'antibiorésistance.....	74
5.4.3.1. Fréquence de susceptibilité et de résistance	74
5.4.3.2. Fréquence de la multirésistance	78
5.4.3.3. Association entre les facteurs de virulence et l'antibiorésistance ...	78

5.5. Discussion	80
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	92
APPENDICE A	94
APPENDICE B	96
APPENDICE C	98
APPENDICE D	99
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1. Colisepticémie a) Péricardite, b) Périhépatite [8]	15
Figure 1.2. Omphalites chez des poussins de 4 jours [29].....	16
Figure 1.3. Syndrome de la grosse tête [38].	17
Figure 1.4. Coligranulomatose (Hjarres's disease) [8].	18
Figure 1.5. Cellulite [8].	19
Figure 2.1. Représentation schématique de la bactérie <i>E. coli</i> [43].	21
Figure 2.2. Représentation schématique des différents pathotypes d' <i>E. coli</i> [8]	23
Figure 2.3. Représentation des différents mécanismes d'infections des divers pathotypes d' <i>E. coli</i> sur des entérocytes [60]	26
Figure 2.4. Diversité phylogénétique des souches d' <i>E. coli</i> [77]	29
Figure 3.1. Représentation schématique des facteurs de virulence des APEC [88].....	30
Figure 3.2. Représentation schématique de la structure du fimbriae de type1 [99] ..	32
Figure 3.3. Représentation schématique de la structure du fimbriae de type P [99]	33
Figure 3.4. Carte génétique circulaire du plasmide pAPEC-O2-CoIV [13]	36
Figure 4.1. Mécanismes d'action et de résistances des antibiotiques [160]	44
Figure 4.2. Le mode d'action de la combinaison triméthoprim /sulfaméthoxazole ..	46
Figure 4.3. Mode d'action des fluoroquinolones [178]	48
Figure 4.4. ORF majeurs dans une région de 30 kpb dans pTJ100 [27]	50
Figure 4.5. Les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide de virulence pCVM29188-146 [26]	52
Figure 5.1: Poulet présentant des lésions caractéristiques de la colibacillose (LOUNIS, 2017)	64
Figure 5.2. Infiltrations leucocytaires (Flèche) et congestion intravasculaire (C) au niveau du foie (X10)	65
Figure 5.3. Infiltrations leucocytaires (flèche bleue) et dégénérescence vacuolaire (flèche noire) au niveau du foie (X10)	65
Figure 5.4. Péricardite avec infiltrations leucocytaires (X4).....	66
Figure 5.5. Péricardite fibrineuse (X4).....	66

Figure.5.6. Lésions observées au niveau du poumon (X4)	67
Figure.5.7. Péripleumonie et congestion vasculaire (X4)	67
Figure 5.8. Résultats de la PCR pour le gène <i>iutA</i>	68
Figure 5.9. Résultats de la PCR pour le gène <i>fimC</i>	68
Figure 5.10. Résultats de la PCR pour le gène <i>iss</i>	69
Figure 5.11. Résultats de la PCR pour le gène <i>hlyF</i>	69
Figure 5.12. Résultats de la PCR pour le gène <i>iroN</i>	70
Figure 5.13. Résultats de la PCR pour le gène <i>ompT</i>	70
Figure 5.14. Résultats de la PCR des gènes diarrhéiques.....	73
Figure 5.15. Fréquence de susceptibilité et de résistance aux antibiotiques chez les APEC.....	75
Figure 5.16. Fréquence de susceptibilité et de résistance aux antibiotiques chez les AFEC.....	76
Figure 5.17. Fréquence de résistance aux antibiotiques chez les APEC et les AFEC	77
Figure 5.18 Fréquence de la multirésistance chez les <i>E. coli</i> testées.....	78
Figure 5.19. Association entre les facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 5.1. Amorces des gènes exprimant des facteurs de virulence spécifiques des APEC.....	60
Tableau 5.2. Amorces des gènes exprimant des facteurs de virulence spécifiques des <i>E. Coli</i> diarrhéiques [201]	61
Tableau 5.3. Prévalence des gènes de virulence chez les APEC et les AFEC.....	70
Tableau 5.4. Fréquence des souches selon le nombre des gènes de virulence	71
Tableau 5.5. Pourcentage des associations des gènes de virulence chez les APEC et les AFEC	72
Tableau 5.6. Prévalence des gènes diarrhéiques chez les APEC et les AFEC	73

INTRODUCTION

La colibacillose est l'une des maladies les plus importantes dans les élevages de volaille engendrant des pertes économiques considérables [1] [2] [3]. Ces pertes sont dues à la morbidité, la mortalité, la diminution de la production, la diminution des taux d'éclosabilité, la saisie des carcasses à l'abattoir et aux coûts de traitement et de prévention [4] [5].

C'est une infection localisée ou systémique caractérisée par divers syndrômes comme la forme respiratoire, la septicémie, le syndrome de la grosse tête, les omphalites et la cellulite [6] [7].

L'agent étiologique de cette pathologie est un type particulier d'*Escherichia coli* (*E. coli*) appelé communément APEC (Avian pathogenic *E. coli*) appartenant aux pathotypes des ExPEC (Extra-intestinal *E. coli*) [2] [8] [9].

Historiquement, le sérotypage était considéré comme étant la méthode de référence utilisée pour classer les souches d'*E. coli* lors des enquêtes épidémiologiques. Bien que la majorité des APEC appartiennent aux sérogroupes O1, O2, et O78, une proportion importante d'entre elles est non typable [8] [10].

Des critères de classification additionnels se sont ajoutés par la suite, basés sur la recherche des facteurs de virulence. Récemment plusieurs facteurs ont été décrits chez les APEC, incluant les adhésines, les systèmes d'acquisition du fer, les capsules, l'hémagglutinine thermosensible, et les protéines de la membrane externe [4] [11] [12] [13] [14]. Dès lors plusieurs combinaisons de ces facteurs de virulence ont été proposées comme moyens de diagnostic des APEC [2] [4] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21].

La combinaison proposée par Johnson et al, (2008) [14] est la plus adoptée par la communauté scientifique. Cette technique repose sur la recherche de 5 gènes localisés sur le large plasmide ColV en l'occurrence : *iroN* (*salmocheilin siderophore receptor N*), *ompT* (*episomal outer membrane protease T*), *hlyF* (*Putative avian hemolysin F*), *iss* (*episomal increased serum survival*) et *iutA* (*Ferric aerobactin receptor A*) [14].

Par ailleurs, des études récentes ont révélé la présence de certains traits génotypiques communément associés des pathotypes d'*E coli* intestinales chez les APEC prouvant augmenter leur potentiel zoonotique. Il s'agit principalement des gènes codant l'intimine responsable des lésions d'attachement et d'effacement (*eae*), les shigatoxines (*stx*), les entérotoxines thermolabiles et thermostables (*elt/est*), l'antigène d'invasion (*ipaH*) et le régulateur de la biosynthèse des protéines fimbriales (*aggR*) [22] [23] [24] [25].

En outre, certains plasmides comme décrit chez les APEC sont constitués d'une mosaïque de gènes de virulence associés à des cassettes de résistance aux antibiotiques [26] [27]. Dans ce sens, la résistance des APEC aux antibiotiques est devenue une préoccupation majeure à l'échelle mondiale. En effet, les APEC sont souvent résistantes aux tétracyclines, au chloramphénicol, aux sulfamides, aux aminosides, aux fluoroquinolones ainsi qu'aux bêtalactamines [28].

En Algérie, la colibacillose aviaire est responsable de pertes économiques majeures. Toutefois, peu de données sur la caractérisation moléculaire des APEC sont disponibles. Les études faites jusqu'à ce jour se sont principalement focalisées sur la caractérisation phénotypique des APEC.

De ce fait, Notre travail a pour objectif dans un premier temps d'évaluer la prévalence des gènes communément associés au pouvoir virulent des APEC notamment les gènes *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA*, et *fimC*. Le deuxième volet de ce travail vise à étudier la prévalence des gènes diarrhéiques parmi les APEC. Lors de cette étude, des souches *E. coli* isolées des matières fécales de poulets cliniquement sains ont été intégrés comme un lot contrôle. La résistance aux antibiotiques a été ensuite testée. Une étude histologique a été enfin réalisée afin de décrire les lésions microscopiques associées à la colibacillose.

Le présent document comporte une partie bibliographique traitant les colibacilloses aviaires, les *Escherichia coli*, les facteurs de virulence ainsi que l'antibiorésistance des APEC.

La partie expérimentale quant à elle consiste en l'étude de la recherche des gènes de virulence associés aux APEC, les gènes diarrhéiques, l'antibiorésistance et à l'étude histologiques des lésions associées à la colibacillose.

CHAPITRE 1

LA COLIBACILLOSE AVIAIRE

1.1. Définition:

Les colibacilloses sont les infections bactériennes les plus fréquentes chez les volailles. Elles représentent vraisemblablement la première cause de traitement antibiotique dans les élevages avicole. Elles peuvent être schématiquement classées en colibacilloses primaires dues à des colibacilles spécifiquement pathogènes et des colibacilloses secondaires, à une infection virale ou à une immunodépression [1] [29] [30].

1.2. Importance:

L'importance des colibacilloses est double: médicale et économique. L'importance économique se traduit par des mortalités, des contre performances des animaux infectés, des troubles de la reproduction (chute de l'éclosabilité, retard de croissance, une augmentation de la mortalité en coquille ou mortalité des poussins les premiers jours), et des coûts élevés de traitement et de prévention [1] [2] [12].

L'importance hygiénique n'est pas négligeable. En effet, plusieurs études ont montré une grande similitude génétiques entre les *Escherichia coli* impliquées dans la colibacillose aviaire et celles impliquées dans les infections extraintestinales chez l'Homme particulièrement les néphrites et les méningites [14] [31] [32] [33].

D'autre part, l'utilisation massive des antibiotiques contre cette maladie a permis l'émergence de souches résistantes présentes dans les carcasses qui seront acquises lors de la manipulation et la consommation de viande de volaille [12] [34].

1.3. Étude clinique et lésionnelle:

1.3.1. Incubation:

La période d'incubation varie entre un et trois jours selon la forme de la maladie. Tous les âges sont réceptifs, mais les jeunes sont les plus sensibles [1].

1.3.2. Formes cliniques:

Les colibacilloses aviaires, contrairement aux infections des mammifères ; se manifestent par des formes cliniques multiples et variées avec une voie d'entrée respiratoire ou génitale. Cette infection est associée à des syndromes variés évoluant sous forme septicémique ou localisée: colisepticémie, maladie respiratoire chronique, omphalite, salpingite, coligranulomatose, synovite.

1.3.2.1. Forme septicémique ou colisepticémie:

La colisepticémie est la forme de colibacillose la plus rencontrée et la plus sévère chez le poulet de chair, le faisan et la dinde [29] [34] [35]. Elle est essentiellement présente chez les animaux de 2 à 12 semaines, avec des pertes importantes entre 4 et 9 semaines [35] [36]. La maladie se manifeste par une chute importante de la consommation alimentaire suivie de l'abattement accompagné d'hyperthermie (42 à 44°C), d'une diarrhée et d'une mortalité brutale [5] [36]. Les animaux les plus atteints présentent alors des signes de détresse respiratoire (bec ouvert, respiration accélérée et irrégulière). Les lésions caractéristiques de cette pathologie sont une aérosacculite, une périhépatite, une péricardite et une péritonite (Figure 1.1) [8].



Figure 1.1: Colisepticémie. a) Péricardite, b) Périhépatite [8].

1.3.2.2. Forme respiratoire:

La maladie des sacs aériens ou maladie respiratoire chronique apparaît principalement chez les poulets âgés de 5 à 12 semaines avec un pic entre 6-9 semaines [34]. La maladie est secondaire à des infections virales (bronchite infectieuse, maladie de Gumboro), une mycoplasmosse (*M. gallisepticum*), ou des agents irritants (ammoniac, poussières) [8] [34] [37]. Les oiseaux malades sont prostrés, anorexiques et présentent des symptômes respiratoires non spécifiques (éternuements, râles, toux, jetage, larmolements, sinusite). L'extension de l'infection (aérosacculite) provoque des lésions fibrineuses des séreuses (péricardite et périhépatite). Plus rarement une panophtalmie, une salpingite, et des infections des os et des structures synoviales peuvent apparaître après une septicémie. Histologiquement, des œdèmes et des infiltrations des hétérophiles sont souvent observés.

1.3.2.3. Omphalites:

Cette forme constitue la cause la plus importante de mortalité chez les poussins durant les premiers jours de leur vie [8]. L'origine de la contamination de l'œuf (et plus précisément de la membrane vitelline) est multiple : elle est essentiellement fécale lors de la ponte, au passage par le cloaque [5] [34].

Cependant, une contamination suite à une salpingite ou une ovarite de la poule est aussi possible [1]. La contamination peut se faire également par voie intestinale [1] [8]. L'ombilic non cicatrisé peut servir comme porte d'entrée. Les œufs contaminés présentent une coquille de moins bonne qualité, plus chaude et mouillée et les mortalités embryonnaires sont constatées durant les derniers jours d'incubation et juste après l'éclosion [1]. Les mortalités se poursuivent après l'éclosion et ce, pendant une période de 3 semaines.

Les poussins peuvent présenter alors des omphalites et des lésions de péricardite (Figure 1.2) [12] [29]. L'ombilic est œdémateux et enflammé, avec présence de croûtes. Le sac vitellin est mal résorbé, avec une paroi opacifiée et congestionnée, un contenu verdâtre à jaunâtre. Cependant la manifestation la plus fréquente est une diminution du gain moyen quotidien, ce qui engendre des pertes économiques conséquentes.



Figure 1.2: Omphalites chez des poussins de 4 jours [29].

1.3.2.4. Syndrome de la grosse tête:

Décrite pour la première fois en Afrique du sud et puis dans plusieurs pays pratiquant l'élevage intensif de volaille, cette maladie est caractérisée par une inflammation aiguë ou subaiguë des cellules de la peau et du tissu sous-conjonctif de la tête et de la région périorbitaire (Figure 1.3) [8] [38].

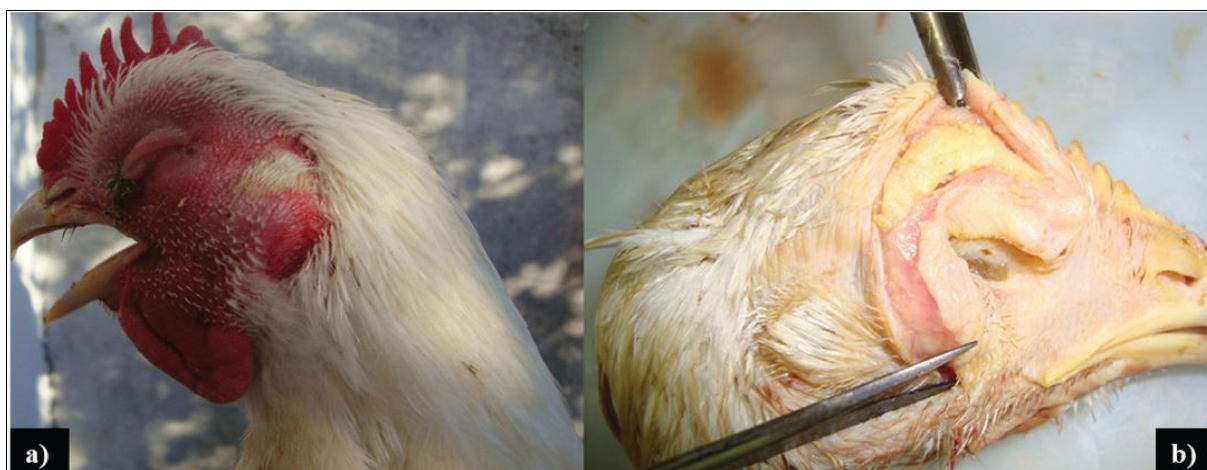


Figure 1.3: Syndrome de la grosse tête [38].

L'enflement de la tête est dû à des œdèmes inflammatoires en réponse à une colonisation des tissus par *E coli* secondaire à une infection par des agents prédisposants comme les virus (pneumovirus, paramyxovirus, coronavirus) ou des teneurs élevées en ammoniac [29]. La maladie apparaît le plus souvent vers l'âge

de 30 semaines. Elle est très peu fréquente mais la majorité des animaux présentant ces symptômes y succombent entraînant des pertes économiques considérables [36].

1.3.2.5. Coligranulomatose (Hjarres's disease):

C'est une forme très rare de colibacillose rencontrée chez le poulet de chair, la poule et la dinde. Elle peut cependant entraîner un taux de mortalité important (jusqu'à 75%) [36]. Elle est caractérisée par l'apparition de granulomes dans le foie, le duodénum, le caecum et le mésentère mais jamais sur la rate ressemblant à des lésions de leucose (Figure 1.4) [8].



Figure 1.4: Coligranulomatose (Hjarres's disease) [8].

1.3.2.6. Ovarites et salpingites:

Cette forme de colibacillose est observée chez les poulettes de 4 à 13 semaines ou chez les adultes se traduisant par des chutes de ponte survenant en particulier au 2-3^{ème} mois de ponte, des morts subites ou des diarrhées blanches [39]. Les oiseaux infectés meurent fréquemment au cours des 6 premiers mois suivant l'infection et les survivants pondent rarement des œufs. C'est l'une des plus importantes causes de mortalité chez la poule pondeuse [29]. La maladie résulte soit d'une infection systémique soit d'une infection ascendante de l'oviducte par le cloaque [12] [36].

L'autopsie révèle des lésions d'ovario-salpingite et de péritonite. Les lésions microscopiques consistent en une diminution de l'épaisseur des parois de

l'oviducte, la présence d'hétérophiles, de fibrine et de débris nécrotiques caséifiés [29] [36].

Cette forme de l'infection est responsable des mortalités embryonnaires, des mortalités en coquille et des mortinatalités chez le poussin [39].

1.3.2.7. Dermatite- cellulite:

La dermatite nécrotique consiste en l'apparition de plaques de fibrine sous la peau située dans la partie inférieure de l'abdomen et entre les cuisses chez le poulet de chair [40]. La maladie n'entraîne ni mortalité ni signes cliniques et est souvent détectée à l'abattoir entraînant des pertes économiques substantielles [8] [12] [37].



Figure 1.5: Cellulite [8].

- a) Propagation de l'exsudat caséux dans l'abdomen,
- b) Irritation de toute la peau

Les lésions microscopiques incluent un épaissement du derme, une légère hyperkératose, une hyperplasie de l'épiderme et une infiltration des monocytes et des hétérophiles [40].

1.3.2.8. Entérite:

L'implication des *E. coli* comme cause primaire d'entérites chez des volailles est rare, L'infection est habituellement secondaire à d'autres affections du type coccidiose, entérite nécrotique, histomonose, parasitisme (vers ou champignons), ou suite à une malnutrition [1] [12] [41].

Cependant, certaines recherches ont montré que les souches des *E. coli* isolées de matières fécales d'animaux sains et des animaux diarrhéiques portent certains facteurs de virulence typiques des *Escherichia coli* impliquées dans les diarrhées chez les mammifères et L'Homme. De plus l'infection expérimentale a été également décrite [29] [37].

Les intestins, surtout les caeca, sont pâles et dilatés par un contenu liquide. Les poulets atteints présentent une diarrhée, différents degrés de déshydratation et une baisse rapide de l'état général.

1.3.2.9. Arthrites et synovites:

Les colibacilles peuvent surinfecter des maladies primitives (arthrites à réovirus, synovite à *Mycoplasma synoviae*) ou être inoculés par des blessures ou traumatismes. Les arthrites s'observent en général chez des poulets ayant survécu à un épisode de colisepticémie et se manifestent le plus souvent par des boiteries et une diminution de la croissance.

CHAPITRE 2

ESCHERICHIA COLI

2.1. Historique:

Escherichia coli a été décrite pour la première fois en 1885 par Theodore ESCHERICH comme un court bâtonnet à Gram négatif aux extrémités arrondies, présent dans les matières fécales et l'intestin des enfants et fut nommée *Bacterium coli commune*. Dès lors, son nom définitif lui a été donné en 1919 par CASTELLANI et CHALMERS en hommage à Theodore ESCHERICH. Depuis, elle devient progressivement l'espèce la plus étudiée sur terre [8] [29].

Initialement, on pensait que toutes les *E. coli* étaient non pathogènes et ce n'est que durant les années 1940 et grâce au système de sérotypage de KAUFFMANN que des associations entre des *E. coli* et certaines pathologies humaines ont commencé à être faites [42].

2.2. Généralités:

De nos jours, *Escherichia coli* est probablement la bactérie la mieux connue et la plus étudiée. Il s'agit d'une bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae* aéro-anaérobie facultative, non sporulée, à Gram négatif d'une taille de 1,5 à 6 μm de long et 0,5-1,1 μm de large (Figure 2.1) [8] [29] [43].

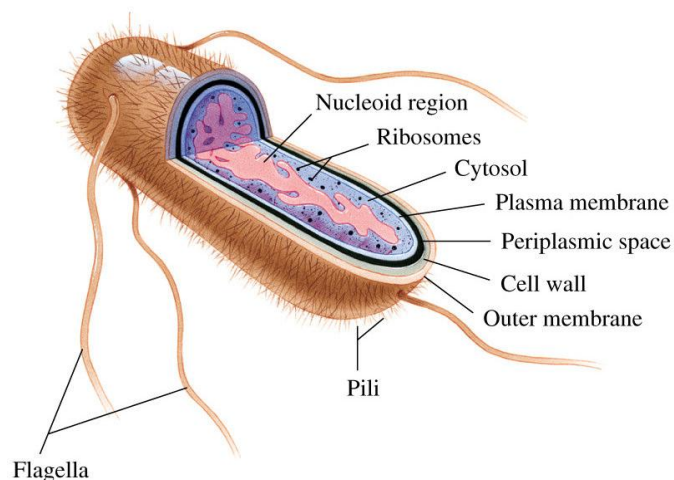


Figure 2.1: Représentation schématique de la bactérie *E. coli* [43].

E. coli possède la capacité de dégrader tous les sucres par fermentation produisant ainsi une grande quantité de gaz. En effet, la formation du gaz résulte de l'action d'un complexe d'hydrogène formiate lyase dégradant l'acide formique issu du clivage de l'acide pyruvique en H₂ et CO₂. Aussi, *E. coli* effectue une fermentation d'acide mixte et produit principalement, en plus des gaz et du lactate, de l'acétate, du succinate et de l'éthanol. Cette espèce produit également de l'indole et a une réaction positive au rouge méthyle alors qu'elle a une réaction négative à l'oxydase, l'utilisation citrate, l'hydrolyse de l'urée, la liquéfaction gélatine, et la production de l'H₂S (sulphide hydrogène) [8] [34] [44].

En culture, *E. coli* se développe à 37°C (18-44°C) sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers de 2 à 3 mm de diamètre. La pigmentation de ces colonies provient de la dégradation du lactose sur les milieux lactosés. Par exemple, lors de la culture sur agar, les colonies de *E. coli* sont vert métallique avec centre foncé sur EMB (Eosin-Méthylène Blue), indiquant la fermentation du lactose et la production d'acide, rouge ou rose sur milieu Mac Conkey et SS (*Salmonella-Shigella*), indiquant également la fermentation du lactose, et jaune rose sur la gélose Hektoen, indiquant la production d'acide [8] [34] [44].

2.3. Principaux pathotypes d'*E. coli* :

Les souches de cette bactérie sont classifiées en pathotypes selon leur contenu en gènes d'importances dans la virulence. Elles sont divisées en deux groupes principaux: les *E. coli* commensales et les *E. coli* pathogènes. Les *E. coli* pathogènes sont divisées de leur part en deux sous groupes: les *E. coli* intestinales (entériques, diarrhéiques, InPEC, DEC) et les *E. coli* extraintestinales (ExPEC) (Figure 2.2) [8] [42] [45].

Les groupes d'*E. coli* entériques incluent les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéropathogéniques (EPEC), les *E. coli* entéroagrégatives (EaggEC ou EAEC), les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), les *E. coli* entéroagrégatives productives de Shigatoxines (Stx) (STEAEC), les *E. coli* Adhero-invasives (AIEC) ainsi que les entéro-invasives (EIEC).

Les *E. coli* extraintestinales (ExPEC) comprennent les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* associées aux méningites néonatales (NMEC), les *E. coli* pathogènes associées aux septicémies (SePEC), les *E. coli* pathogéniques associées aux infections mammaires (MPEC), les *E. coli* pathogènes associées aux infections endométriales (EnPEC) et les *E. coli* pathogènes d'origine aviaire (APEC)

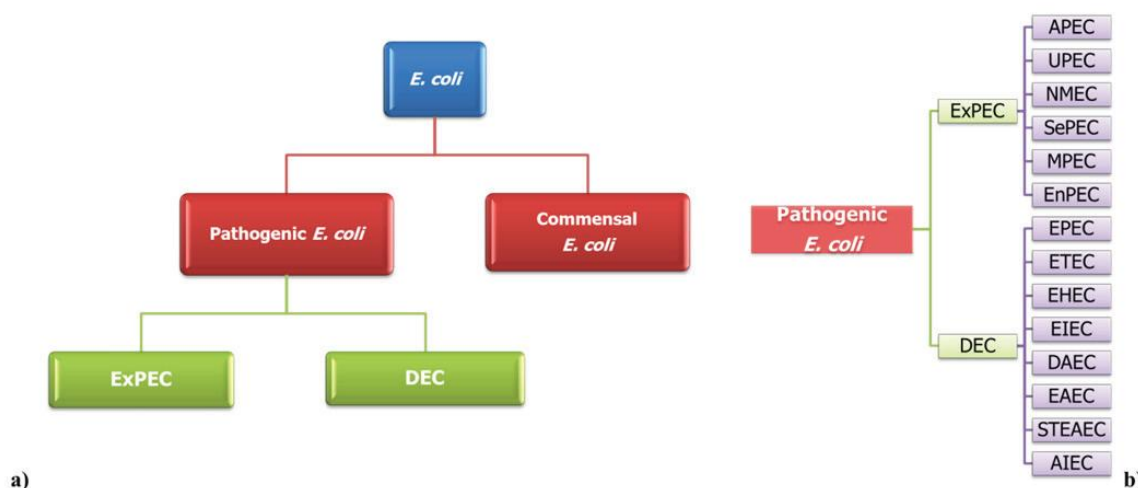


Figure 2.2: Représentation schématique des différents pathotypes d'*E. coli* [8].

2.3.1. *E. coli* intestinales :

2.3.1.1. *E. coli* entéropathogènes (EPEC) :

Comme leur nom l'indique, les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont à l'origine de gastroentérites infantiles et animales (chien, chat, bovin, ovin, lapin, porc). Elles se caractérisent par la présence d'un îlot de pathogénicité "LEE" (Locus of enterocytes effacement) codant pour un système de sécrétion de type III (T3 SS). Ce système de sécrétion T3SS entraîne une translocation du récepteur "Tir" (récepteur de l'intimine) situé à la surface des cellules hôtes favorisant ainsi l'interaction entre l'intimine "eae" sécrétée par les bactéries et son récepteur au niveau des cellules hôtes. Ceci aboutit à un attachement intime de la bactérie à la surface des entérocytes du duodénum et du jéjunum [46].

Cette interaction conduit ultimement à la destruction de la bordure en brosse des microvillosités (Figure 2.3) [46]. Ce type de lésions typique des EPEC est dit lésions d'attachement et d'effacement "A/E" qui caractérisent les gastroentérites EPEC induites [47] [48] [49].

2.3.1.2. *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) :

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont à l'origine des colites hémorragiques et/ou du syndrome urémique hémolytique chez l'humain et les animaux. Certains animaux comme les bovins, les ovins, les chats, les chiens ainsi que les lapins sont considérés comme réservoirs de ces bactéries [50]. La virulence de ces bactéries est liée à leur capacité à produire des Shigatoxines (Stx) anciennement appelées vérotoxines (VT) notamment Stx1 et Stx2. Dès leur sécrétion, Stx1 et Stx2 inhibent toute production protéique intracellulaire ce qui induit une mort cellulaire [47]. L'espèce représentative de ce pathotype est *E. coli* O157:H7 associée initialement à la consommation de viande de bœuf hachée aux USA en 1982 [51] [52].

2.3.1.3. *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) :

Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), appelées également la turista, provoquent des syndromes diarrhéiques très souvent associée aux voyageurs séjournant dans des conditions douteuses. Ces bactéries codent pour des adhésines fimbriales et des toxines fortement associées à leur pathogénie. Les adhésines présentent généralement une spécificité d'hôte. Par exemple, la F4 (K88) est spécifique des souches porcines tandis que la F5 (K99) est caractéristique des souches porcines et bovines [53]. En revanche, les toxines définies comme étant des protéines extracellulaires sont classées dans deux principaux groupes, les toxines stables à la chaleur (ST) et les toxines instables à la chaleur LT [8] [53]. Suite à l'infection, les ETEC adhèrent aux microvillosités de l'intestin grêle sans provoquer de lésions morphologiques grâce aux adhésines fimbriaires. Dès lors, les ETEC relâchent des entérotoxines entraînant l'hypersécrétion de fluides dans la lumière intestinale et d'électrolytes tout en réduisant la capacité d'absorption de l'intestin conduisant ultimement à l'apparition des diarrhées [53] [54].

2.3.1.4. *E. coli* entéroagréguatives (EAggEC, ou EAEC):

Se sont des souches proches des EPEC, et dont le mécanisme d'action ne fait intervenir aucun des facteurs de virulence des autres souches. Ces souches sont reconnues comme cause principale des diarrhées persistantes chez les jeunes enfants et les personnes âgées surtout associées aux pays en voie de développement et des coliques hémorragiques dans les pays industrialisés [55] [56] [57].

Une des caractéristiques spécifiques de ces bactéries est leur adhérence entre elles, formant des agrégats, d'où leur nom d'entéro-agrégatives. Cette adhérence en agrégats est due à leur possession d'un type particulier de fimbriae « Aggregative Adherence Fimbria » (AAF) leur permettant de se coller en agrégats entre-elles, mais aussi aux tissus cibles pour les coloniser. Les EaggEC peuvent produire plusieurs cytotoxines et entérotoxines encore mal caractérisées, mais causant potentiellement la diarrhée. Ces toxines sont les ShET1 (*Shigella* enterotoxin 1), EAST-1 (enteroaggregative heat-stable enterotoxin) et la toxine Pet (plasmid-encoded toxin) [58]. Leur rôle dans la pathogénie n'est par contre, pas complètement compris. L'expression de la plupart de ces facteurs de virulence semble être sous la dépendance de l'activateur de transcription AggR [59].

2.3.1.5. *E. coli* entéroinvasives (EIEC):

Ces souches sont proches des *Shigella* spp. et ont la capacité de franchir la membrane cytoplasmique, et évoluent ensuite à l'intérieur des cellules de leurs hôtes, échappant ainsi au système immunitaire. Le pouvoir invasif de ces souches s'explique en grande partie par des facteurs de virulence codés au niveau du plasmide pINV leur conférant la capacité à envahir les cellules épithéliales, ce qui provoque des ulcérations de la muqueuse du gros intestin chez les personnes atteintes [8] [47].

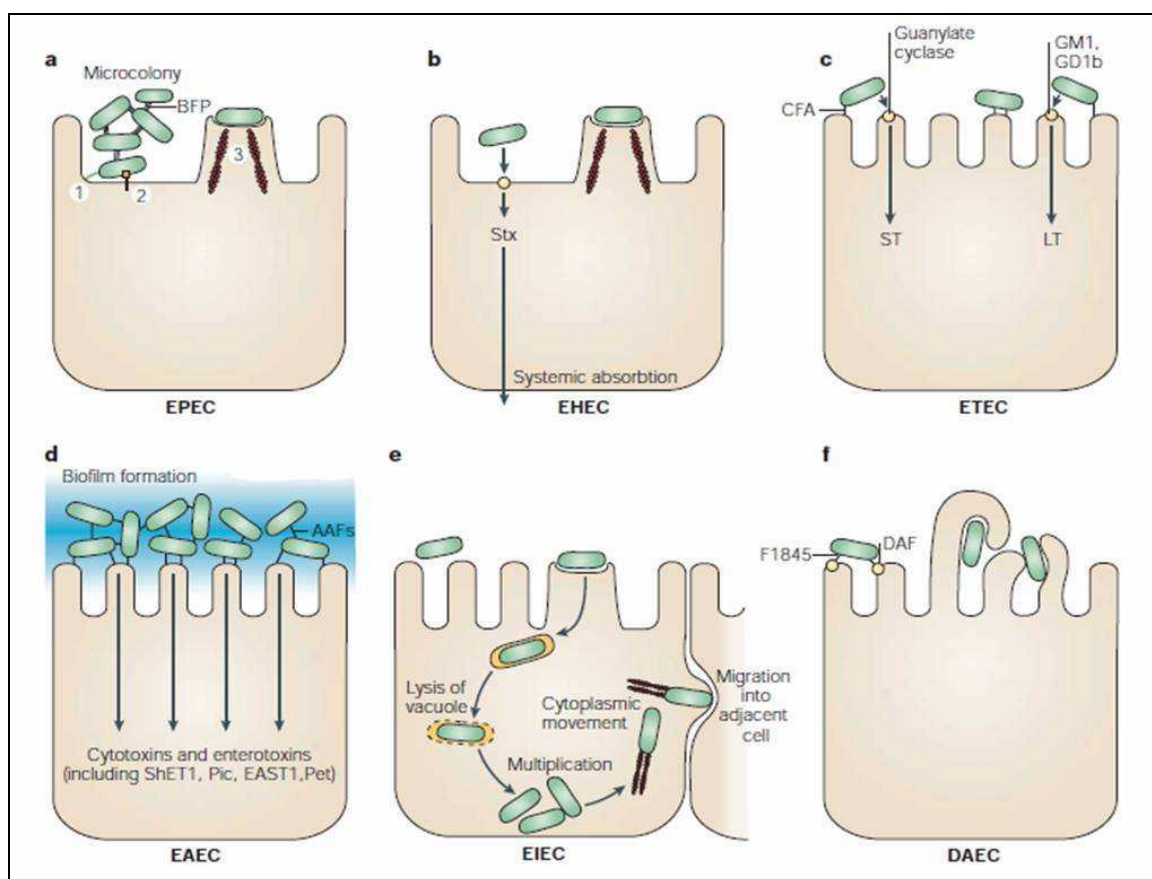


Figure 2.3: Représentation des différents mécanismes d'infections des divers pathotypes d'*E. coli* sur des entérocytes [60].

a) EPEC : Utilise les « Bundle Forming Pili» (BFP) pour leur adhérence ainsi que le LEE et le SST3. b) EHEC : Production de la Stx et adhérence à l'aide du LEE et SST3. c) ETEC : Production des toxines ST et/ou LT et adhérence à l'aide de «colonization factor antigens» (CFA). d) EAEC (EAEC) : agrégative avec les «Aggregative Adherence Fimbria» (AAF) et plusieurs toxines. e) EIEC : Invasion des cellules par lyse des vacuoles.

2.3.2. *E. coli* pathogènes extraintestinales (ExPEC):

Le terme ExPEC désigne une classe d'*E. coli* spécialisées dans les infections des tissus autres que l'intestin. Ce groupe de bactéries présente une grande variabilité aussi bien sur le plan génotypique que phénotypique. Elles sont capables de coloniser la circulation sanguine [38], le liquide céphalorachidien [61], les sacs aériens chez la volaille [21] [62] [63] et le tractus urinaire des mammifères [38].

Les ExPEC codent pour une multitude de facteurs de virulence, incluant les adhésines fimbriaires (F1, P, S), les systèmes de séquestration du fer

(aérobactine et gènes *iro*), les hémolysines (CNF1), la capsule, et bien d'autres [21] [64].

En fonction de leur tropisme, les ExPEC se subdivisent en plusieurs sous groupes dont les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) et les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont les deux groupes prédominants. De plus, les ExPEC traversent la barrière d'espèce étant donné que les souches humaines sont génétiquement proches des souches aviaires [12] [32] [65] [66].

2.3.2.1. *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) :

Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) sont responsables de la colibacillose aviaire. Il s'agit de bactéries faisant partie de la flore intestinale de volailles comme le poulet, la dinde et le faisan. Dans un environnement propice, certaines souches vont cependant transiter hors de l'intestin et provoquer des infections systémiques telles que les aérosaculites, les péricardites, les péritonites, les salpingites, les ostéomyélites et les omphalites pouvant mener jusqu'à la mort des volailles infectées.

Les APEC possèdent plusieurs facteurs de virulence à l'origine de leurs pathogénicité. Parmi ces facteurs de virulence, le système d'acquisition du fer autrement dit l'aérobactine "*iucD*", codée sur des plasmides de haut poids moléculaire, permet à la souche de se multiplier en dehors de l'intestin ou le fer est en faible quantité en conférant à la bactérie une capacité de capture de fer [13] [21] [36] [67]. De plus, les APEC possèdent également des fimbriae de type 1 et P pouvant potentiellement participer à leur adhérence au tractus respiratoire du poulet [36]. Par ailleurs, le gène d'hémagglutination thermosensible "*tsh*" est également caractéristique des souches APEC pathogènes et pourrait aider ces bactéries à causer des lésions lors de l'infection [68].

Autres que ces gènes, les APEC peuvent posséder une multitude d'autres gènes de virulence partagés avec d'autres pathotypes tels que les adhésines, les capsules K1 et K80, les protéines résistantes au sérum "*iss*", les protéines de la membrane externe ainsi que les toxines : shigatoxine, colibactine ou d'autres systèmes de captation du fer comme la salmochéline "*iroN*" ou la yersiniabactine [11] [13] [67].

Dans la suite de ce manuscrit, seul les APEC seront étudiés dans les sections phylogénie et classification. Aussi, le prochain chapitre est dédié à l'étude des différents facteurs de virulence associés à la pathogénie des APEC.

2.4. Sérogroupes des *E. coli* :

Outre le système de classification par les pathotypes, les souches d'*E. coli* peuvent également être classifiées selon l'antigène O autrement dit sérotype. Ce dernier est contenu par Les lipopolysaccharides de la surface des *E. coli*. Le sérotypage conventionnel se fait par agglutination avec des antisérums développés pour chacun des sérogroupes O [8] [69]. Plusieurs techniques PCR ont été également développées permettant l'identification des différents sérogroupes d'*E. coli* [69]. Parmi environ 186 sérogroupes d'*E. coli* une multitude d'entre eux a été détecté chez les APEC. Ces sérogroupes présentent un polymorphisme aussi bien sur le plan génotypique que phénotypique [11] [70] [71].

Bien qu'une proportion importante de souches APEC soit non-sérotypable, les sérogroupes O1, O2, et O78 sont les plus représentatifs de la population des APEC [1] [2] [5] [10]. De plus, les sérogroupes O3, O4, O5, O6, O8, O11, O12, O14, O15, O18, O20, O21, O35, O36, O53, O55, O81, O83, O85, O88, O102, O103, O109, O115, O116, O132, et O152 ont également été associés aux APEC [8] [21] [37] [72] [73]. Il est important de noter que certains sérogroupes sont particulièrement associés à des pathologies. A titre d'exemple, le sérotype O15 est lié à la synovite, O109 à l'aérosacculite et O115 à la dermatite nécrotique [73] [74] [75]. Aussi, les sérogroupes O12, O14, O18, O53, O78, O81, O102, O115, O116, et O132 ont été identifiés comme presque exclusivement associés à la septicémie [72] alors que le O85 et O111 sont associés à la colisepticémie de la poule [29].

2.5. Groupes phylogénétiques des *E. coli*:

À part le sérotypage, la phylogénie est une technique supplémentaire pour déterminer la pathogénicité et/ou l'origine des *E. coli* [76]. En effet, Les groupes phylogénétiques donnent une information supplémentaire à analyser conjointement avec le sérotypage ou la présence des facteurs de virulence [66].

En utilisant le séquençage génomique multilocus (MLST) ou par PCR, sept groupes phylogénétiques ont été déterminés à savoir les groupes A, B1, B2, C, D, E et F (Figure 2.4) Le groupe C est relié au groupe B1. Les groupes A, B1, B2 et D (Figure 1) sont les quatre groupes les plus importants [77] [78] [79].

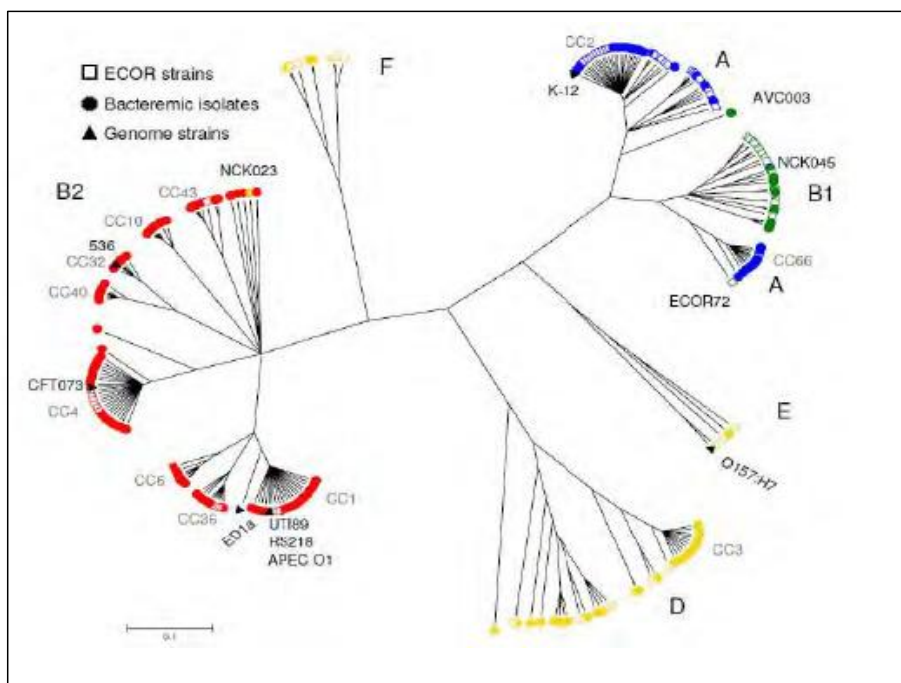


Figure 2.4: Diversité phylogénétique des souches d'*E. coli* [77].

Les cercles représentent l'analyse de 161 souches isolées d'une bactériémie ; les carrés représentent 67 souches ECOR ; et les triangles représentent 7 génomes de référence.

En rouge le groupe B2, en vert le B1, en jaune le D, et en bleu le groupe A.

Les APEC appartiennent généralement aux groupes A, B1, B2 et D. L'analyse phylogénique selon la méthode de Clermont et al, (2000) [78] dans plusieurs pays montre que la majorité des APEC appartiennent au groupe A. De plus, plusieurs études ont montré que les APEC sont en général attribués aux groupes phylogénétiques A et B2, A et B1 ou bien aux groupes A et D [15] [17] [21] [66] [80] [81] [82] [83] [84]. Une étude réalisée sur des APEC de l'Europe révèle par contre que les groupes phylogénétiques les plus prépondérants sont B2, ensuite D et finalement B1 [90]. D'une autre part, les groupes phylogénétiques A, B1 et B2 sont également retrouvés dans la viande de volaille. Même si le groupe B2 est moins présent comparé aux autres groupes, les bactéries de ce groupe possèdent des facteurs de virulence leur permettant de coloniser d'avantage de cellules [86] [87].

CHAPITRE 3

FACTEURS DE VIRULENCE DES APEC

Il est de plus en plus admis que la possession de certains gènes chromosomiques ou plasmidiques codant des facteurs de virulence confère aux souches APEC une pathogénicité propre due à leur capacité de survie dans l'hôte.

Ces facteurs de virulence regroupent les adhésines (fimbriaires ou afimbriaires) impliquées dans l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales, la résistance à l'activité bactéricide du complément ou résistance au sérum, nécessaire à la survie des bactéries dans le sang, les systèmes de captation du fer (aérobactine), utiles à la multiplication des bactéries dans le sang et les toxines comme l'hémolysine et la cytotoxine nécrosante (CNF) dont l'effet est de favoriser le franchissement de la barrière épithéliale par les colibacilles (Figure 3.1) [10] [12] [38] [88].

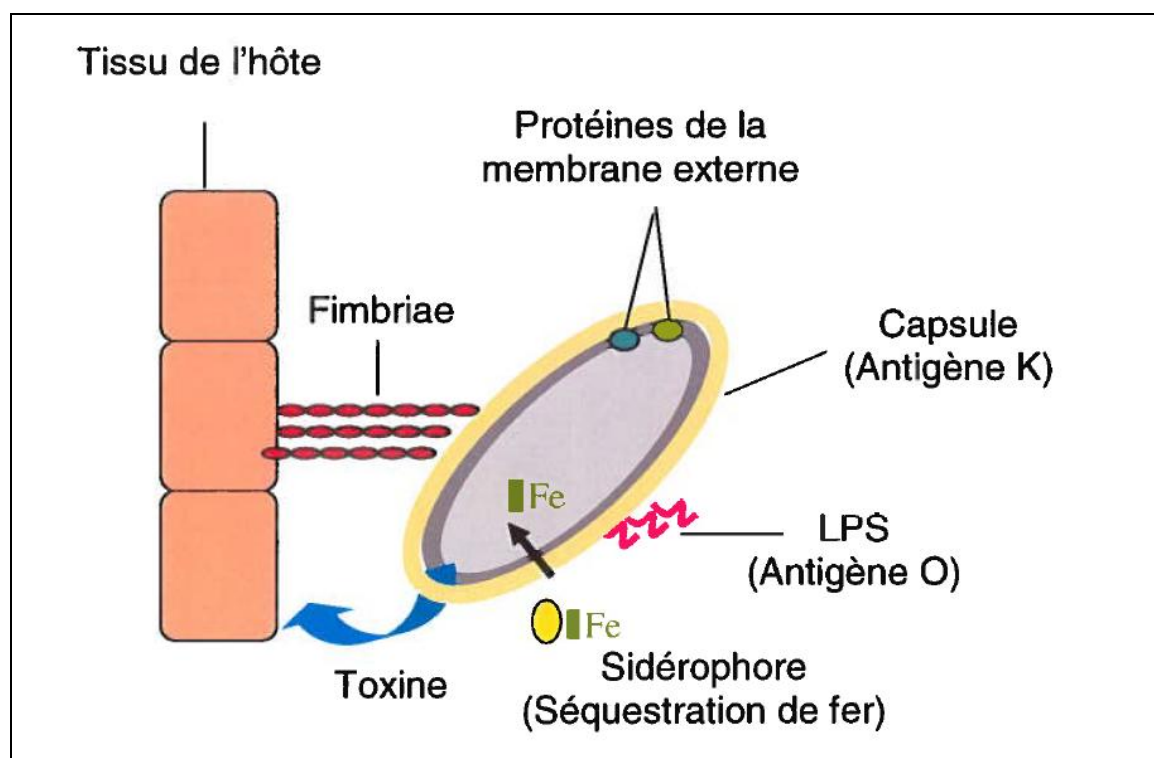


Figure 3.1: Représentation schématique des facteurs de virulence des APEC [88].

3.1. Les capsules :

Les capsules polysaccharidiques (antigène K) jouent un rôle dans la résistance bactérienne à l'immunité spécifique et non spécifique de l'hôte. Aussi, elles confèrent à la bactérie une protection contre l'effet bactéricide du sérum et contre la phagocytose facilitant ainsi la colonisation des organes internes [35] [89].

Chez *E. coli* on en compte au moins 80, cependant très peu d'entre elles sont associées aux infections invasives [90]. La capsule K1 est fréquemment associée aux APEC de sérogroupe O1, O2 et non typables tandis que la capsule K80 est associée au sérogroupe O78 [37] [38]. En effet, des travaux de POURBAKHS 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 [91]. De plus, MELLATA et al (2003) ont démontré que la capsule K1 augmente la capacité de colonisation des organes internes chez la volaille ainsi que la résistance au sérum des souches APEC [92]. Cette capsule K1 est également associée aux souches septicémiques humaines et animales [75].

Certains auteurs par contre ont montré que le pourcentage des APEC possédant des capsules est très bas [93] [94]. Ces résultats ont été confirmés génétiquement dans certaines études épidémiologiques basées sur la recherche des gènes *kps* et *neu* chez les APEC rapportant des taux ne dépassant pas les 16% si ce n'est une absence totale [21] [65] [81] [95] [96].

3.2. Les adhésines :

Il s'agit de structures permettant aux bactéries d'adhérer aux tissus épithéliaux de l'hôte jouant ainsi un rôle primordial dans les phases précoces de la pathogenèse d'*E. coli*. Précisément, elles confèrent aux bactéries une résistance au système de défense et une facilité de la multiplication bactérienne [38]. Chez les APEC, une multitude d'adhésines sont connues dont les plus importantes sont les fimbriae de type 1, les fimbriae P et les curli. La présence d'autres adhésines a été démontré parmi les souches APEC, telles que l'adhésine PilS et les fimbriae AC/1, F17, Afa, Sfa, Eae, Crl, Csg [35] [36] [38] [93] [97] [98].

3.2.1. Les fimbriae de type 1 :

Les fimbriae de type 1 sont codées par le locus *fim*. Il s'agit d'un opéron formé de neuf gènes (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimG*, *fimF*, *fimH* et *fimI*) codant pour les sous-unités de structure, les chaperons et les protéines régulatrices de l'expression des fimbriae (Figure 3.2) [99] [100]. À l'image des autres adhésines, les fimbriae de type 1 sont impliquées dans l'initiation de la colonisation de l'épithélium des voies respiratoires en se fixant sur les récepteurs riches en mannosides des cellules épithéliales de la trachée et des macrophages [38] [101].

Les fimbriae de type 1 sont présentes chez la majorité des souches APEC. Plusieurs études ont rapportées des prévalences d'environ 90% des gènes *fim* chez les APEC [3] [4] [18] [93] [102] [103] [104] [105]. Dans ce sens, des travaux réalisés sur des APEC isolées de cas de colisepticémie ont révélé une prévalence de 100% du gène *fim* [106] [107].

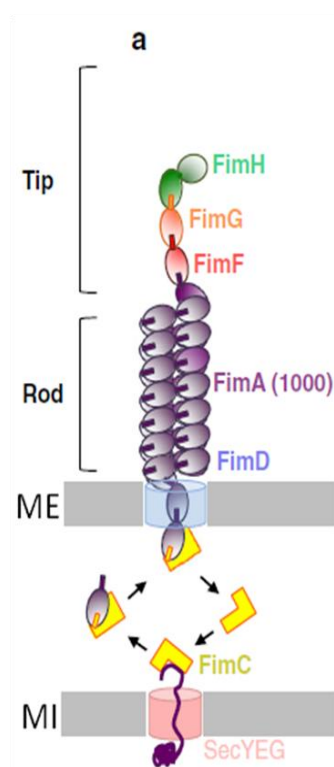


Figure 3.2: Représentation schématique de la structure du fimbriae de type 1 [99].

3.2.2. Les fimbriae P:

Morphologiquement indissociables des fimbriae de type 1, les adhésines fimbriales de la famille P se définissent sur la base de leurs propriétés d'agglutination des érythrocytes humains du groupe sanguin P [108] [109]. Cette

spécificité est à l'origine de la dénomination fimbriae P ou adhésines fimbriales de la famille P. Ce type d'adhésines est codé par les gènes *pap* "pyelonephritis-associated pili" étant donné que ces fimbriae ont d'abord été décrites chez les *E. coli* appartenant aux UPEC. Le système *pap* comprend 9 gènes structuraux et 2 gènes régulateurs. Le gène *papA* code pour la protéine structurale majeure (PapA), *papB* et *papI* sont des gènes de régulation responsables du processus de variation de phase (Figure 3.3) [99] [110]. Le gène *papE* code pour une sous unité mineure de l'extrémité de la structure fimbriaire. Le pouvoir adhésif du fimbriae lui est conféré par l'adhésine papG spécifique des digalactosides et située à l'extrémité distale du fimbriae.

Au microscope électronique les fimbriae P apparaissent sous forme d'hétéro-polymères composés de l'unité de structure PapA et des pilines PapE et PapF et de l'adhésine PapG [111]. Cependant, la protéine PapA ne semble pas impliquée dans l'adhésion. Ceci a été confirmé par les travaux de LUND et al, (1987) montrant que PapA est facultatif à l'adhésion tandis que PapF et PapG sont essentiels [112].

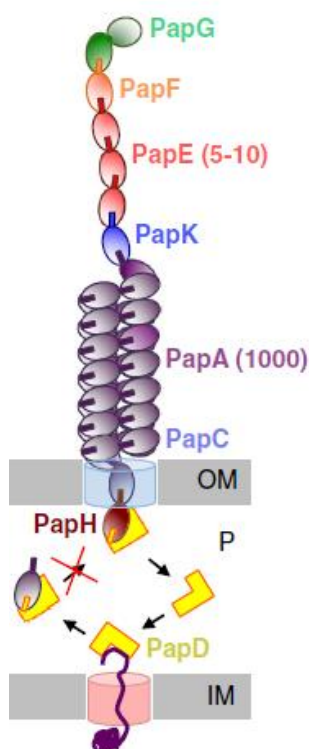


Figure 3.3: Représentation schématique de la structure du fimbriae de type P [99]

Bien que moins fréquents que les fimbriae de type 1 chez les APEC, les fimbriae P sont principalement associés aux colisepticémies. Leur prévalence est de l'ordre de 20% chez les APEC [4] [21] [103]. Toutefois, la prévalence des gènes *pap* est de 41.2% chez les souches APEC colisepticémiques. Ceci est environ trois fois la prévalence des gènes *pap* chez les *E. coli* des oiseaux en santé [93]. Les gènes de l'opéron *pap* ont été aussi détectés dans 20% et 8% des isolats d'*E. coli* provenant de cas de colibacilloses et d'omphalites/salpingites respectivement [18] [113] [114].

Sur le plan de la pathogénicité, le rôle des fimbriae P n'est pas encore complètement élucidé. Il semble qu'ils ne sont pas impliqués dans les premières étapes de l'infection mais ont plutôt un rôle dans la persistance de l'infection dans les organes internes et la généralisation de la septicémie [91]. Les travaux de KARIYAWASAM et al, (2006) ont démontré que l'opéron *pap* est présent sur un îlot de pathogénicité des souches APEC-O1. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la présence de *pap* dans une région qui peut être horizontalement acquise pourrait entraîner la transformation des souches avirulentes en souches virulentes [115].

3.2.3. Les curli :

Les curli désignent des structures filamenteuses spiralées présentes à la surface des *E. coli* aussi bien pathogènes que non-pathogènes [35] [97]. Elles confèrent à ces bactéries la capacité de fixer la fibronectine, la lamine, et d'autres protéines du sérum ainsi que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et le rouge Congo [116]. L'expression des curli est codée par 2 opérons, *csgBAC* et *csgDEFG*. Le gène *csgA* code pour la sous-unité majeure du curli appelé curlina tandis que le gène *csgB* code pour la protéine nécessaire à la stabilité du complexe [35] [38].

Le rôle des curli dans la pathogénèse de l'infection par les *E. coli* n'est pas très connu, cependant les curli pourraient avoir un rôle dans l'activation de la coagulation en cascade du fibrinogène et l'induction des cytokines pro inflammatoires suggérant leur contribution dans la colonisation et les premières étapes de l'infection [35] [117].

Dans la plus part des études, la présence des curli est plus souvent associée aux APEC qu'aux *E. coli* saprophytes [98] [118] [119]. Par exemple, le gène *csgA* est fréquemment présent chez les souches APEC [98] [118]. D'autre part, AMABILE De CAMPOS et al, (2005) ont montré que la totalité des souches d'*E.coli* associées aux septicémies étaient porteuses du gène *csgA*, alors que ce gène n'a pu être trouvé parmi les isolats d'AFEC (Avian Faecal *E. coli*) [98].

Cependant, l'association entre le gène *csgA* et la pathogénicité des APEC a été controversé dans d'autres études. MCPEAKE et al, (2005) démontrèrent que *csgA* est présent chez les souches d'*E. coli* isolées aussi bien du poulet septicémique que du poulet sain [93]. Ces derniers démontrèrent que *csgA* est présent chez les *E. coli* virulents mais aussi chez la souche non virulente K-12 [97].

3.3. Les protéines de la membrane externe OMP:

3.3.1. *iss* «increased serum survival »:

Bien que leur rôle dans la virulence des souches APEC ne soit pas complètement élucidé, les gènes *iss* codant pour les protéines membranaires Iss sont fortement associés aux APEC. Il s'agit de gènes codés par le plasmide ColV. Parmi les isolats provenant des cas de colibacillose, la fréquence du gène *iss* est variables, elle est cependant plus élevée chez les APEC que chez les AFEC [3] [18] [82] [120] [121] [122] [123]. De plus, DE BRITO et al, (2003) ont montré que 83% des isolats d' *E. coli* provenant des cas de cellulite possédaient ce gène alors qu'aucun isolat provenant d'animaux sains ne le possédait [124]. Il a été également rapporté que la présence d'*iss* sur le plasmide ColV augmenterait 100 fois la virulence des souches chez le poussin [125] et de 20 fois la résistance au complément [126] [127]. Même si le rôle d'*iss* dans la pathogénicité des APEC reste méconnu, ces observations pourraient suggérer un rôle dans la résistance des souches porteuses dans la résistance au sérum.

3.3.2.TraT :

Tout comme *iss*, le gène *traT* code pour les protéines membranaires dites TraT. Son rôle dans la virulence des souches APEC n'est pas complètement

élucidé. Le gène *traT* a été trouvé sur les plasmides ColV, R6-5 et R100. Il s'agit d'un gène rencontré plus fréquemment chez les APEC que chez les souches commensales. Bien que le rôle exact de cette protéine dans la virulence des APEC ne soit pas connu, il est probablement attribuable à d'autres gènes de virulence portés sur le même plasmide de virulence ColV (Figure 3.4) [13] [92].

Toutefois, MELLATA et al, (2003) ont montré que les APEC *iss* et *traT* positifs ayant perdu les antigènes K1 et O n'étaient plus protégées contre l'effet bactéricide du sérum. Comparées aux souches sauvages *iss* négatif, ces APEC étaient plus résistantes. Ces observations suggèrent un rôle limité des gènes *iss* et *traT* dans la protection contre le sérum [92].

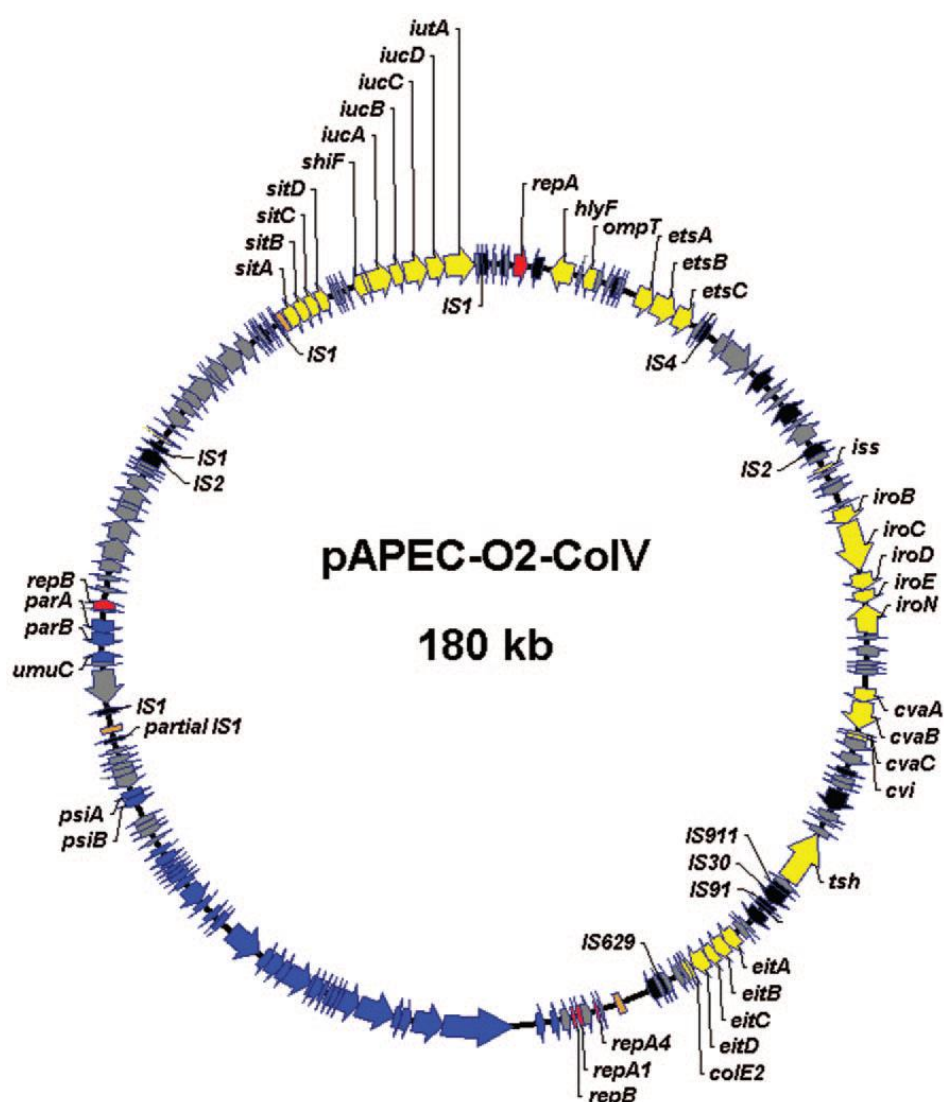


Figure 3.4: Carte génétique circulaire du plasmide pAPEC-O2-ColV [13]
Les flèches indiquent la direction de transcription des gènes, les flèches jaunes indiquent les gènes de virulence associés

3.3.3. OmpT:

OmpT dite aussi "Outer membrane protein T" est une aspartyl protéase localisée dans la membrane externe des *E. coli*. Alors que son rôle précis dans la pathogenèse des *E. coli* soit peu connu, il a été suggéré qu'elle soit impliquée dans l'adhérence de la bactérie aux cellules eucaryotes [128]. Cette protéine est positivement régulée dans les cellules endothéliales humaines comme conséquence à l'adhésion des *E. coli*. Cette augmentation serait due principalement à l'activité protéolytique facilitant ainsi l'invasion bactérienne [129]. D'une autre part, une étude récente a établi un lien direct entre le gène *OmpT* et la virulence des souches APEC. Selon HEJAIR et al, (2017) [130], l'inactivation d'*OmpT* réduit considérablement le pouvoir d'adhésion et d'invasion des APEC *in vitro*. Aussi, cette mutation diminue la virulence des APEC de 15 fois et de 9 fois dans les modèles canard et souris respectivement. Dans le modèle poulet, cette mutation diminue d'environ 2 fois la capacité de colonisation et d'adhésion des APEC dans le cerveau, les poumons et le sang. Ceci serait probablement lié à la réduction du taux d'expression des gènes *OmpA*, *fimC* et *tsh* [129] [130].

3.4. L'Hémagglutinine thermosensible (Tsh) :

Tsh est une protéine autotransporteur de la serine-protéase. Il s'agit d'une protéine de surface thermosensible capable d'agglutiner les érythrocytes à température basse (26°C-30°C), Cette activité est par contre réprimée à 42°C [38] [131]. Elle est synthétisée sous forme de protéine précurseur de 140 kDa dont la forme mature est de 118 kDa. La protéine précurseur est formée de deux sous-unités, une de 33 kDa et une deuxième sous-unité de 106 kDa. La première sous unité insérée sur la membrane externe fonctionne comme un domaine passager alors que la deuxième sous-unité se localise temporairement dans la membrane externe où elle joue un rôle d'adhésion dans la phase initiale de l'infection bactérienne avant d'être sécrétée dans l'environnement extracellulaire [38] [132]. De ce fait, Tsh présente potentiellement une activité protéolytique faisant d'elle une protéine bifonctionnelle, avec une activité adhésive et une activité protéolytique [38] [133].

Tsh est codé par le gène *tsh* situé sur les plasmides ColV, ColBM et pAPEC-1 largement répandus parmi les APEC [11] [13] [67] [131]. C'est un des facteurs de virulence les mieux étudiés chez les APEC et a été proposé comme marqueur moléculaire de détection des APEC [4]. Sa présence chez les APEC permettait de classer les souches parmi les plus virulentes [4].

D'autre part, environ la moitié des souches d'*E. coli* provenant de cas cliniques aviaires posséderaient le gène *tsh* [4] [15] [68] [81] [98] [105] [118] [134] [135]. Des taux plus élevés dépassant les 75% ont été obtenus par contre par certains auteurs pour le gène *tsh* ([102] [107] [136] [137] alors que MCPEACK et al, (2005) ont rapporté des taux dépassant les 93% aussi bien chez les APEC que les AFEC [93]. Bien qu'il ne soit pas déterminant pour l'infection généralisée, la présence de *tsh* contribue au développement de lésions dans les sacs aériens [68].

3.5. Les systèmes d'acquisition du fer (IROMPs) :

Afin de s'affranchir de la faible disponibilité du fer chez l'hôte, les APEC possèdent des systèmes de captation du fer appelé "IROMPs" (iron-regulated OMPs). Ces systèmes souvent plasmidiques et parfois chromosomiques jouent un rôle important dans la virulence des APEC [13] [97]. Les IROMPs se divisent en 3 catégories à savoir les sidérophores (phénolates ou hydroxymates), les chélateurs de faible poids moléculaire et les transporteurs de protéines (G proteine-like transporter) [97] [138].

L'aérobactine fait partie des sidérophores fréquemment associés aux APEC. Il s'agit d'un système de captation efficace du fer permettant aux bactéries qui le possèdent de survivre en présence de faibles concentrations en fer et par la même occasion de se multiplier dans le sang ou les organes internes. Il est codé par 2 groupes de gènes *iuc* (Iron-Uptake Chelate) et *iut* (Iron-Uptake Transport). Les enzymes codées par les gènes *iucABCD* sont responsables de la synthèse de l'aérobactine alors que les gènes *iut* codent pour son récepteur membranaire [139]. Il a été démontré que la production de l'aérobactine est plus fréquente chez les APEC que chez les souches non-pathogènes d'*Escherichia coli* [18] [123]

[139]. De plus *iucD* et *iutA* ont été sélectionnés comme marqueurs pour la détection et la caractérisation rapide des APEC [4] [14].

Hormis l'aérobactine, l'entérobactine anciennement appelé salmochéline est également fortement associée à la virulence des APEC. Il s'agit d'un système sidérophore codé par le locus *iro* [139]. Les gènes *iroBCDEN* contribuent à la virulence des APEC [97] [139]. Des recherches précédents ont montré qu'une complémentation des bactéries *E. coli* non pathogène par les gènes *iroBCDEN* permet à la bactérie d'acquérir de la virulence, alors que l'absence des gènes *iroC*, *iroD*, *iroB* ou *iroN* conduit à l'abrogation du pouvoir pathogène de ces bactéries. Cependant, la présence du gène *iroE* ne semble pas être indispensable pour le maintien de la virulence étant donné que la présence d'*iroBCDN* est suffisante pour rétablir complètement la virulence des souches [139]. De plus, cette étude a montré que parmi les APEC étudiées, 82% possédaient les gènes *iro* tandis que seulement 31% des isolats commensaux de la flore fécale du poulet étaient porteurs de ce gène.

En plus du locus *iro*, les gènes *fepA-G* (Ferric-Enterobactin Protein) sont également impliqués dans la synthèse de l'entérobactine. Ils permettent la formation du récepteur membranaire FepA et du transporteur périplasmique FepB. Des études récentes ont associées le portage des gènes *fepA* et *fepC* au pathotype APEC [38] [97] [140] [141].

D'autres groupes de gènes liés au système de transport du fer chez les APEC notamment les gènes *sitABCD* et *eitABCD* ont également été identifiés. Les gènes *eitABCD* (periplasmique binding protein) sont associés aux plasmides ColV, ColBM et pAPEC-2 [13] [67] [97]. Cependant, les gènes *sitABCD* de virulence sont portés par le plasmide pAPEC-1 et leur présence confère aux APEC une résistance aux effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène [142] [143].

Les gènes *irp2* (Iron repressible protein 2), *fyuA* (Ferric yersiniabactin uptake) codant pour les yersiniabactines, le gène *IreA* codant pour un récepteur de siderophore et le gène *chuA* codant pour récepteur de l'hème ont été également détectés chez les APEC [4] [21] [102] [135] [141].

3.6. Les toxines:

Plusieurs toxines (*astA*, *cnf1/2*, *sat*, *stx*, *vat*, *est/elt* et *hly*) ont été décrites chez les APEC [4] [66].

PARREIRA et GYLES, (2002) ont identifié le gène *stx1* parmi 52% des souches d'*E coli* isolées de cas de colibacillose chez la dinde. Les mêmes auteurs ont également décrit une toxine vacuolatrice nommée VAT chez les APEC [144] décrite plus tard par d'autres auteurs [4] [19]. *Vat*, ou «vacuolating autotransporter», est une protéine de 148.3 kDa comprenant 75% d'homologie avec Tsh. Le gène *Vat* est localisé typiquement sur un îlot de pathogénicité, il est adjacent au gène ARNt *thrW*. *Vat* a une fonction cytotoxique induite par la formation de vacuole intracellulaire [144].

L'entérotoxine EAST1 (enteroaggregative heat-stable enterotoxin 1) codée par le gène *AstA* a été décrite chez les *E. coli* entéroaggrégatives connues comme agents de diarrhée. Bien que son rôle dans la pathogénie ne soit pas complètement élaboré chez les APEC, elle a été décrite avec une fréquence qui avoisine les 20% [4] [17] [135] et peut atteindre des taux de 62% [145].

La toxine CNF (Cytotoxic necrotizing factor) est une cytotoxine capable de déréguler plusieurs processus cellulaires tels que la forme des cellules, la motilité, la formation des adhésions, l'endocytose, le cycle cellulaire, le trafic vésiculaire et l'apoptose. Plusieurs études ont recherché cette toxine chez les APEC, les résultats ont décrit des taux très bas ne dépassant pas les 5% [18] [21] [66] [134]. Elle est plus fréquente par contre chez les ExPEC humains [18] [65].

3.6.1. L'hémolysine alpha :

L'hémolysine alpha est une toxine formant des pores au niveau de la membrane cellulaire codée par le cluster *hly*. Outre la destruction cellulaire, l'une des fonctions plausibles de l'hémolysine alpha est l'obtention des nutriments, libérés soit par la destruction cellulaire soit via les pores membranaires. *HlyA* peut aussi inhiber l'activation d'Akt (protéine kinase B) et provoquer des oscillations de la concentration de calcium intracellulaire, ce qui module la survie de la cellule hôte, la réponse inflammatoire, la prolifération et le métabolisme [146] [147] [148]. Le gène *hlyF* également porté par le cluster *hly* constitue un des marqueurs des

APEC [14]. Il est situé au niveau du plasmide commun des APEC ColV. Bien que des propriétés hémolytiques lui aient été attribuées, la contribution de *hlyF* dans la virulence des APEC reste méconnue. Toutefois, les travaux de Skyberg et al, (2008) ont montré une augmentation considérable de la transcription de *hlyF* dans un modèle d'infection des embryons de poulets laissant penser à une implication potentielle dans l'établissement de l'infection [149]. Parallèlement, d'autres travaux ont suggéré une contribution de *hlyF* dans la production des OMVs (outer membrane vesicles). Cette induction aurait pour rôle la livraison des toxines des APEC aux cellules hôtes [150].

3.7. Utilisation des facteurs de virulence comme outil de diagnostic chez les APEC

Il est clair aujourd'hui que différentes méthodes de diagnostic des APEC ont été suggérées. Le sérotypage, par exemple, est une technique très utilisée. Toutefois, cette méthode ne permet pas une identification solide des souches APEC étant donné l'existence de souches non sérotypables. Aussi, cette technique ne peut pas être considérée comme une méthode de diagnostic vu que le sérotype ne reflète pas le pouvoir pathogène. Dès lors, plusieurs méthodes de génotypage moléculaire ont été proposées [10] [44]. La difficulté de ces techniques réside dans l'impossibilité de la coexistence de tous les facteurs de virulence dans la même souche APEC sans oublier la présence de certains facteurs de virulence dans les AFEC.

Plusieurs études ont tenté de définir la combinaison idéale des facteurs de virulence permettant de distinguer les souches APEC de celles des AFEC. Dans l'ensemble, ces méthodes reposent sur la détection des facteurs de virulence associés au plasmide colicin V (ColV) en utilisant des PCR multiplex. L'étude de JONHSON et al (2008) [14] est l'une des études pionnières dans ce domaine en proposant un panel de PCR multiplex ciblant la combinaison de facteurs de virulence, *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, et *ompT*, fortement associée aux APEC hautement pathogène [14]. Une autre étude de SCHOULER et al, (2012) [2] avait défini 4 profils de combinaison des facteurs de virulence hautement associés à la pathogénicité des souches APEC à savoir la combinaison *iutA*+, P(F11)+, la combinaison *iutA*+, P(F11)-, *frzorf4*+ la combinaison *iutA*+, P(F11)-, *frzorf4*-, O78+ ainsi que la combinaison *iutA*-, *aec26*+, *sitA*+ [2]. Hormis ces travaux, JEONG et

al, (2012) avaient également défini une autre combinaison incluant les facteurs de virulence fimC, tsh, hlyF, iroN, iucD, fyuA, irp2, iss, ompT, vat, lt, st, stx1 et stx2 pour définir le profil APEC [15]. En effet, même si les APEC ont plus tendance à posséder certains gènes de virulence que les AFEC, il est encore impossible de classer de manière absolu un *E. coli* comme étant un APEC ou un AFEC.

Au bilan, de plus en plus de résultats existant sur le sujet suggèrent l'absence d'un patron précis de combinaison de facteur identifiant clairement les APEC.

CHAPITRE 4

RÉSISTANCE DES APEC AUX ANTIBIOTIQUES

A l'heure actuelle, le traitement de la colibacillose repose encore essentiellement sur l'antibiothérapie. Les antibiotiques les plus utilisés sont les β -lactamines, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines et les aminosides [151] [152].

Cependant, les taux de résistance des APEC aux antibiotiques sont de plus en plus élevés [153] [154]. De plus la résistance aux fluoroquinolones a été décrite quelques années après l'introduction de cette classe d'antibiotique dans la filière avicole [155] [156].

4.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

4.1.1. Résistance aux β -lactamines:

Le mode d'action des antibiotiques de cette famille qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames repose sur leur capacité à inhiber la synthèse de la paroi bactérienne (Figure 4.1).

La résistance aux Bétalactamines chez les entérobactéries passe principalement par la production des enzymes β -lactamases [157]. Ces enzymes sont codées essentiellement par les gènes *blaTEM-1*, *blaTEM-2* et *blaSVH-1* leur conférant une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline et les autres pénicillines ainsi que les céphalosporines de première et de deuxième génération mais sont sensibles à l'acide clavulinique [158]. Cependant, depuis les années 1980 et suite à l'introduction de nouvelles bétalactamines, une mutation de ces gènes a permis l'émergence de β -lactamases résistantes aux céphalosporines de troisième génération : les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) [157] [159].

D'autres BLSE ont été ensuite décrites et ont pris une place importante chez les entérobactéries dont les principales sont celle du type OXA et CTX-M [158].

Les céphalosporinases de type AmpC comme les BLSE sont résistantes aux céphalosporines de troisième génération. De plus, elles sont résistantes à l'acide clavulinique et à d'autres inhibiteurs des β -lactamases [158].

Ces enzymes comme CMY, ACT, FOX, ACT et DHA sont codées par plusieurs gènes portées par un plasmide nommé plasmide médiant la β -lactamase AmpC, ou simplement pAmpC [157] [159].

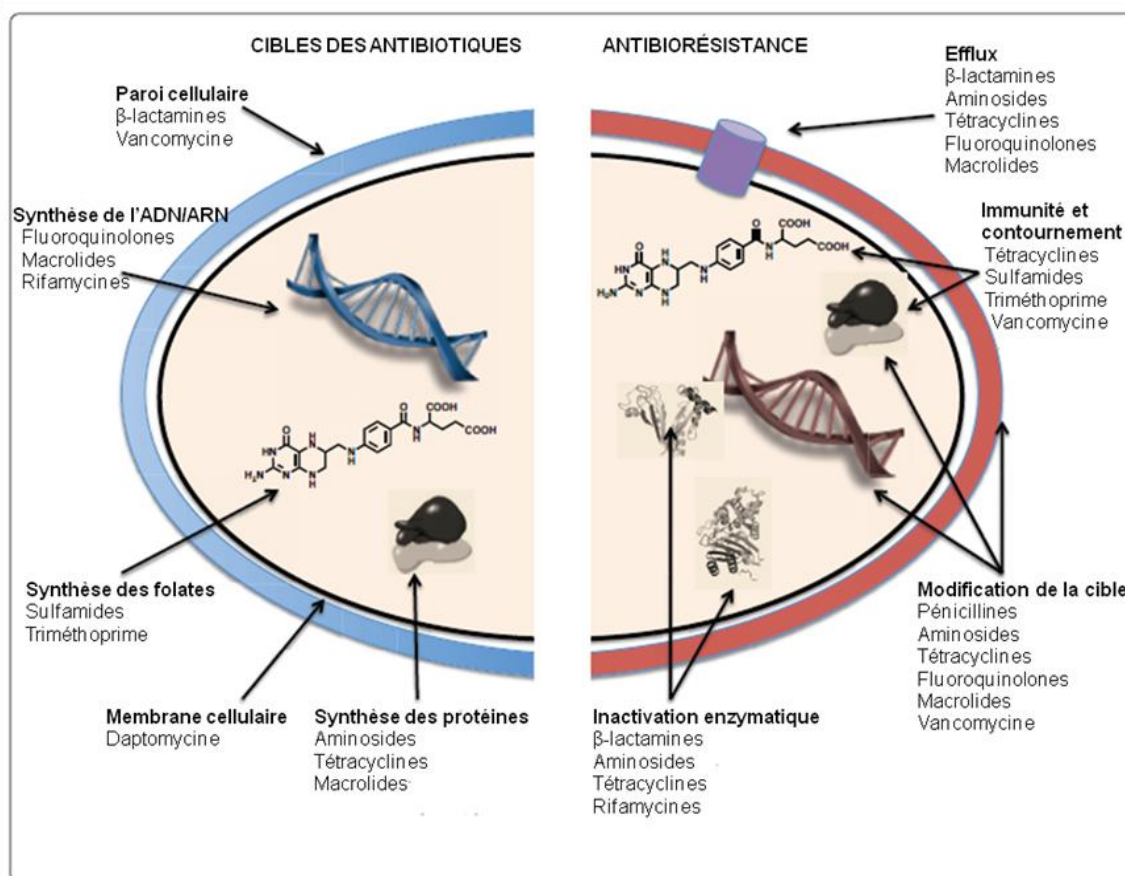


Figure 4.1: Mécanismes d'action et de résistance des antibiotiques [160]

Au niveau mondial, la résistance aux pénicillines est généralement assez élevée, parmi les souches d'*E. coli* aviaires [6] [161] [162] [163].

En Algérie, la prévalence de ce type de résistance peut atteindre les 90% chez les APEC et les AFEC [164] [165].

Les travaux de BELMAHDI et al, (2018) ont révélé que 100% des *E. coli* aviaires résistantes analysées étaient porteuses du gène *blaTEM-1*. De plus, 70% d'entre eux coexpriment le gène *blaSHV-12* tandis que 20% co-expriment le gène *blaCMY-2* [165].

4.1.2. Résistance aux tétracyclines :

La tétracycline est l'un des antibiotiques les plus largement utilisés en production animale. Il s'agit d'un antibiotique actif contre un large spectre de bactéries de la classe des cyclines produit par les bactéries du genre *Streptomyces*. Les tétracyclines agissent par inhibition de la synthèse protéique. Elles empêchent la fixation de l'aminoacyl-ARNt occupant le site A du ribosome.

De très fortes prévalences de la résistance des *E. coli* aux tétracyclines ont été rapportées chez la plupart des espèces d'élevage [155] [166] [167] [168]. La prévalence des souches résistantes aux tétracyclines parmi les APEC dépasse les 80% dans plusieurs études [155] [169] [170]. En Algérie, si BENAMEUR et al, (2016) [171] avaient retrouvé une prévalence de 92% parmi les AFEC, MESSAI et al, (2015) [164] avaient évoqué une prévalence de 100% chez les APEC [163] [171].

La résistance à la tétracycline est codée par plus d'une quarantaine de gènes différents (*tet*) portés par des plasmides, des transposons ou des intégrons qui codent pour un mécanisme d'efflux à l'origine de l'augmentation de l'excrétion de l'antibiotique, des protéines protégeant les ribosomes de la bactérie et une inactivation enzymatique [172]. Le mécanisme principal de résistance chez les *E. coli* est la pompe à efflux codée principalement par les gènes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* et *tetE* [161] [172].

4.1.3. Résistance aux aminosides :

Ces antibiotiques agissent en interférence avec le ribosome bactérien modifiant ainsi sa fonction de synthèse protéique. Bien qu'il existe peu de travaux décrivant le taux de résistance des APEC aux aminosides en Algérie, l'étude de Belmahdi et al, (2016) a révélé un taux de résistance supérieur à 90% des *E. coli* aviaires pour la streptomycine [165].

La prévalence mondiale des souches résistantes à la streptomycine est encore plus élevée quand il s'agit des souches APEC, dépassant les 80% [155] [168]. Chez les *E. coli*, la résistance à la streptomycine et la spectinomycine dépend principalement de l'acquisition des gènes *strA*, *strB* et *aadA*. Une attention particulière est souvent accordée à la présence du gène *aadA* qui est associé à

l'intégron 1 chez les souches d'*E. coli*. Cependant, il est important de noter que l'intégron 1 soit en partie responsable de la multirésistance chez les *E. coli* [154] [155] [168].

4.1.4. Résistance au triméthopime/sulfaméthoxazole (TMP-SMX) :

Le triméthopime est un antibiotique synthétique de la famille des diaminopyrimidines agissant en synergie avec le sulfaméthoxazole. Cet antibiotique est utilisé en médecine vétérinaire pour freiner le développement d'un large spectre de bactéries comprenant *E. coli*. Le triméthopime agit par inhibition de la synthèse des acides nucléique et des protéines. Plus précisément, il inhibe le fonctionnement de l'enzyme dihydrofolate réductase catalysant la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate nécessaire à la synthèse des bases nucléique. Cependant, le sulfaméthoxazole agit au niveau de la synthèse du dihydrofolate. L'association bloque ainsi la synthèse du tétrahydrofolate aboutissant ainsi à un effet bactéricide (Figure 4.2).

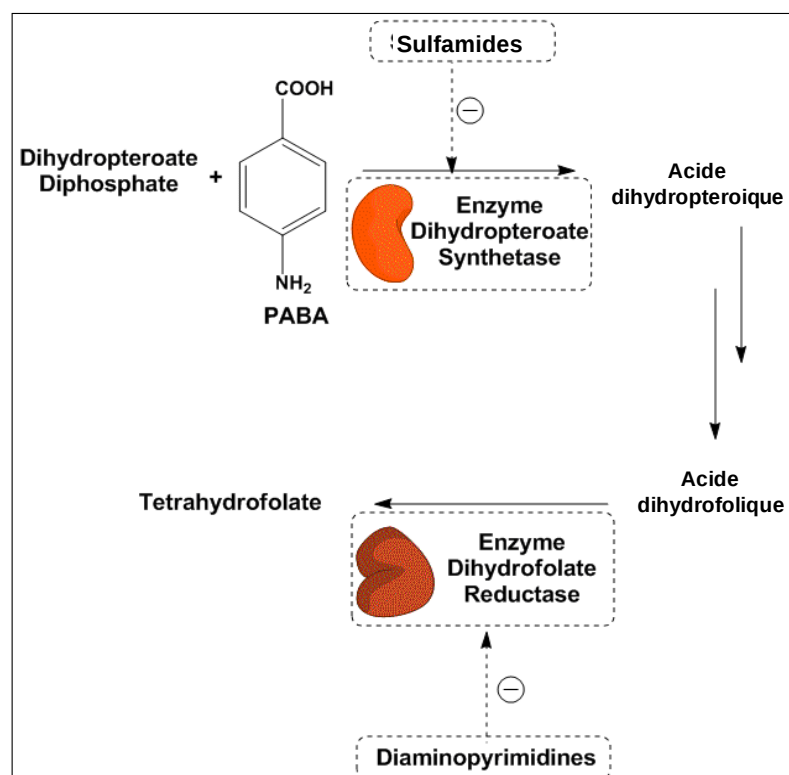


Figure 4.2: Le mode d'action de la combinaison triméthopime /sulfaméthoxazole.

Des études Algériennes réalisées chez le poulet ont montré des taux de résistance à la combinaison TMP-SMX dépassant les 80% chez les APEC comme chez les AFEC [164] [171].

De toutes les familles d'antibiotiques, l'association sulfamide-triméthoprim possède indiscutablement la plus grande diversité de mécanisme de résistance acquise et de leur support génétique: modification de la perméabilité, activation de pompes d'efflux, modification quantitative ou qualitative des cibles, contournement métabolique, hyperproduction de précurseurs, absence de certaines enzymes et toute une variété de gènes exogènes acquis par la bactérie [173].

Cependant, le principal mécanisme de résistance à cette association chez *E. coli* est l'acquisition de gènes portés par une cassette codant pour des enzymes de la famille des dihydrofolates réductase (*dfr*) possédant plus de 15 variantes alléliques dont *dfr17* est l'une des plus importantes. En effet, cette variante allélique serait associée à l'augmentation de la prévalence de la résistance des UPEC au TMP-SMX [174]. De plus, l'intégron de classe 1 est également trouvé dans environ 70% des souches d'*E. coli* résistantes à cette association. Aussi, les intégrons de classe 1 contiennent un gène *sul* codant pour la résistance aux sulfamides [175] [176].

4.1.5. Résistance aux fluoroquinolones :

Les fluoroquinolones constituent un traitement curatif de choix en médecine vétérinaire. Par exemple, L'enrofloxacin a été développée spécialement pour un usage vétérinaire. Les fluoroquinolones constituent la 3^{ème} génération des antibiotiques de la famille des quinolones. Ces antibiotiques ont été développés suite à la substitution des molécules quinolones par un atome de fluor en position 6. L'ajout du fluor confère à la molécule non seulement une meilleure activité contre les bactéries à Gram négatif mais aussi l'extension de son spectre vis à vis de certains germes Gram positif.

À l'image des autres antibiotiques de la famille des quinolones, les fluoroquinolones induisent le blocage de la réplication bactérienne en inhibant l'ADN gyrase et la topoisomérase II et IV (Figure 4.3) [177] [178].

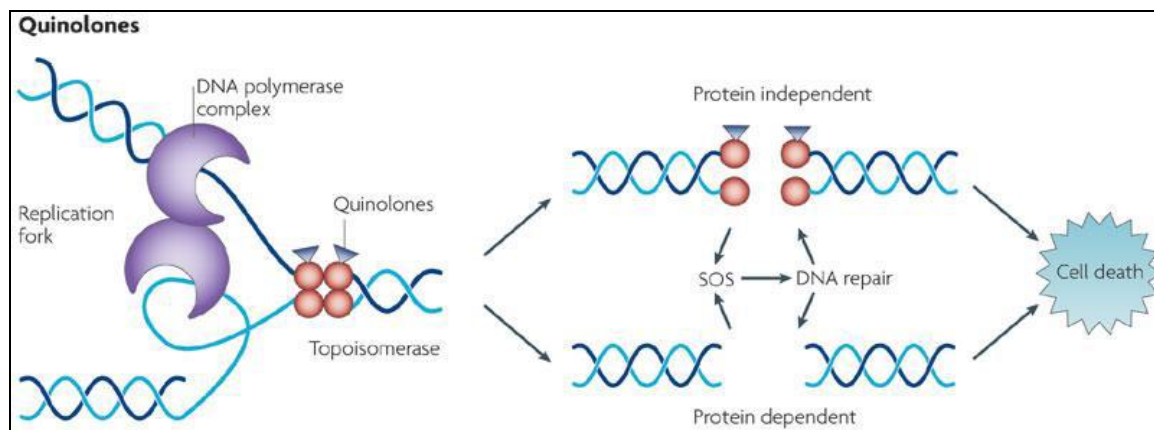


Figure 4.3: Mode d'action des fluoroquinolones [178].

Malgré l'émergence de la résistance, les fluoroquinolones possèdent une excellente activité contre les bacilles Gram négatif. Cependant, leur utilisation en production aviaire est considérée par certains scientifiques comme inappropriée du fait des résistances croisées avec les fluoroquinolones utilisées comme traitements de dernier recours en médecine humaine [179]. En effet, une émergence inquiétante de résistance aux fluoroquinolones chez les souches d'*E.coli* aviaires est observée mondialement [156] [162] [180] [181].

Chez les bactéries Gram négatif, cette résistance est déclenchée suite à des mutations chromosomiques réduisant la perméabilité membranaire et diminuant l'accumulation des quinolones dans la cellule bactérienne ou à une altération de la topo-isomérase. Cependant, la résistance aux fluoroquinolones des *E. coli* est plus souvent associée à des mutations ciblant les sous-unités *gyrA* et *gyrB* de l'ADN gyrase ou la sous-unité *parC* de la topoisomérase. La résistance aux quinolones en général dont les fluoroquinolones peut également être la conséquence de l'acquisition de plasmides de résistance PMQR (Plasmid Mediated Quinolone Resistance) codant un des gènes suivants: *qnr*, *qepA* et *aac(6')-Ib-cr* [182] [183] [184].

Des travaux réalisés en 2015 et en 2016 en Algérie ont évoqués une résistance supérieure à 80% dans les isolats d'APEC et les AFEC analysées [164] [171] [185]. Aussi, les études d'AGABOU et al (2016) [185] ainsi que LAAREM et al, (2017) [186] ont rapporté un taux de résistance à la ciprofloxacine dépassant 50% [185] [186]. La résistance des APEC analysées par AGABOU et al (2016) serait due au portage du gène *aac(6')-Ib-cr* chez 22% des isolats analysés cependant aucun des isolats ne porte les gènes *qnr*, *qepA* et *oqxAB* [185].

Inversement, environ 10% des isolats étudiés par LAAREM et al, (2017) [186] ont été positif pour le gène *qnr* à savoir les allèles *qnrB* et *qnrS-type* sans qu'aucun des isolats ne soit positif pour le gène *aac(6')-Ib-cr* [186].

4.1.6. Résistance à la colistine:

La colistine (polymixine E) est un antibiotique polypeptidique actif contre les bactéries Gram négatifs. Elle agit en se fixant sur les lipopolysaccharides (LPS) et les phospholipides de la membrane externe entraînant son altération et la fuite des substances intracellulaires ce qui conduit à la mort de la bactérie [187].

Même si la colistine a été utilisée pour des dizaines d'années à titre préventif ou curatifs contre les infections par les entérobactéries chez les animaux partout dans le monde et principalement dans les élevages de volaille, la prévalence de résistance à cet antibiotique est très basse [188]. Cependant, les études les plus récentes en Chine ont montré que la résistance à la colistine semble être en augmentation chez les *E. coli* d'origine animale du fait de l'utilisation massive de cet antibiotique [189].

Cette résistance a été pour longtemps considérée comme le résultat de mutations génomiques de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des lipopolysaccharides [187]. Cette idée a été changée par la description d'un plasmide médiant la résistance à la colistine chez les souches d'*E. coli* [190]. Ce plasmide porte le gène *mcr-1* codant pour une phospho-ethanolamine transférase, une enzyme impliquée dans la modification des lipides A [190]. Depuis, le gène *mcr-1* a été décrit chez les APEC dans plusieurs pays [191] [192] [193].

4.2. Association entre la virulence des APEC et leur résistance aux antibiotiques:

La coexistence des éléments génétiques mobiles notamment les plasmides, les intégrons et les transposons est à l'origine de l'association génétique entre la virulence et la résistance aux antibiotique des *E. coli* en général [26] [97] [194]. Parmi ces éléments génétiques, les plasmides pTJ100 et pCVM29188-146 jouent un rôle clé dans l'association de la virulence et la résistance aux antibiotiques chez les APEC [26] [27].

L'analyse d'une région du plasmide pTJ100 révèle la présence d'une mosaïque de gènes de virulence notamment le gène de résistance au sérum *iss*, le gène codant l'hémagglutinine thermosensible *tsh* ainsi qu'un gène codant l'aérobactine *iucC*. Outre ces gènes de virulence, le plasmide pTJ100 code également pour une cassette de résistance aux antibiotiques comprenant les métaux lourds (*silP*), un gène de résistance à la tétracycline (*tetA*), un gène de résistance des β -lactamines (*bla*) en plus de d'autres gènes de résistance aux antibiotiques tels que *aadA4* (Résistance à la streptomycine/spectinomycine), *aadB* (résistance aux aminosides), *catB3* (résistance au chloramphénicol), *qacE Δ 1* (résistance à l'ammonium quaternaire) et *sulI* (résistance aux sulfamides) (Figure 4.4). Sur ce plasmide, on trouve également les séquences de deux transposons *Tn21* et *Tn3*, une région *Tn21-like* qui comprend entre autre l'intégron de classe 1 (*In2*) (Figure 4.4) [27] [90].

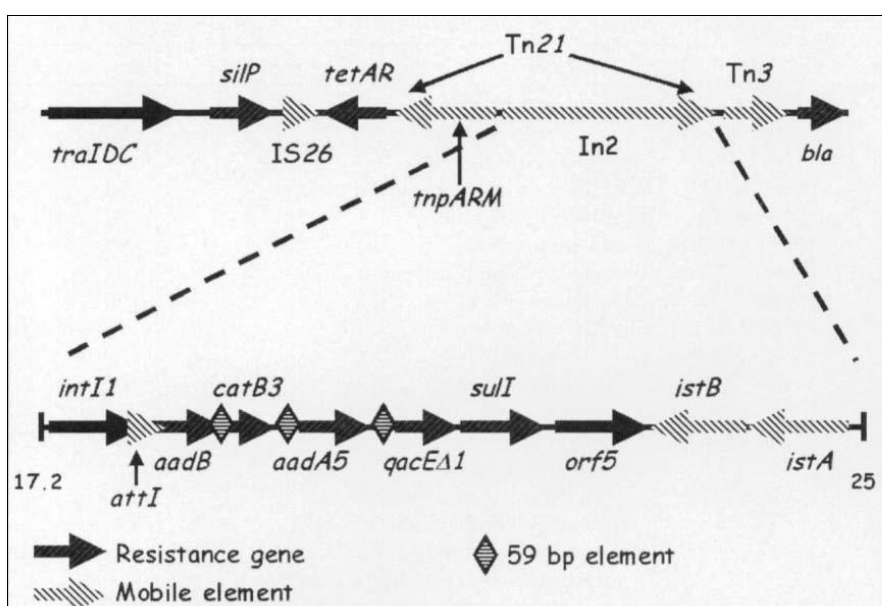


Figure 4.4: ORF majeurs dans une région de 30 kpb dans pTJ100 [27].

(ORF : Open Reading Frame : Cade de lecture ouvert)

Le plasmide pCVM29188-146, quant à lui, porte des gènes de virulence dont le gène codant un récepteur de l'aérobactine *iutA*, un gène codant l'entérobactine *iroN* et le gène responsable de la synthèse de la protéine de la membrane externe *OmpT* de même que les gènes de résistance aux antimicrobiens aminosides, *strAB* et les tétracyclines *tetAR* (Figure 4.5).

De plus, le plasmide pCVM29188-146 possède 90% d'identité nucléotidique avec les plasmides pAPEC1, pAPEC-O1-ColBM et pAPEC-O2-ColV provenant de souches APEC [11] [26] [195]. Ces 4 plasmides possèdent en commun des gènes de virulence tels que: *iutA*, *iucABCD*, *iroBCDEN*, *etsABC*, *sitABCD* et *OmpT* [13] [11] [196]. En tenant compte de la possibilité de coexistence de ces plasmides chez une même souche APEC ainsi que de leur mobilité conjointe de plusieurs plasmides chez les *E. coli* on pourrait tenter de comprendre l'association génétique entre la virulence et la résistance aux antibiotiques chez les APEC [11] [26].

D'un point de vue épidémiologique, très peu d'études ont abordée ce sujet. Ces études ont rapporté globalement que les souches APEC sont moins résistantes aux antibiotiques que les souches AFEC aviaires [63] [197] [198]. Dans ce sens, les travaux du même auteur JOHNSON et al, (2003) [198] ont révélé une résistance aux céphamycines et aux fluoroquinolones chez plus de 95% des souches d'*E. coli* commensales intestinales aviaire tandis que cette prévalence n'excède pas 33% pour les 2 antibiotiques chez les ExPEC [198]. Lors de cette étude, les auteurs ont également prouvé une association négative de certains gènes de virulence notamment *hlyD*, *iroN*, *iutA* et *ompT* à la résistance aux fluoroquinolones [198].

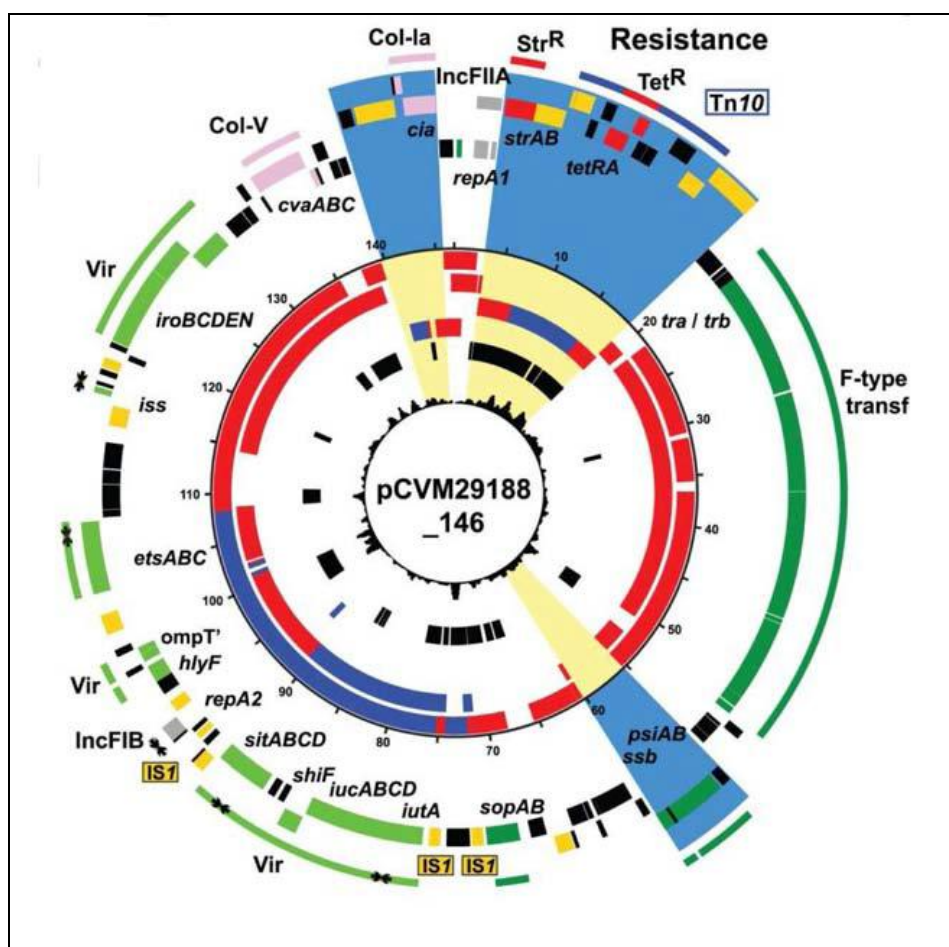


Figure 4.5: Les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide de virulence pCVM29188-146 [26].

Actuellement, aucune explication scientifique claire n'existe pour ce phénomène [199]. Toutefois, une des hypothèses putatives est celle de MORENO et al, (2006) [200] suggérant la perte de plasmides de virulence en faveur des plasmides de résistance aux antimicrobiens par un phénomène de déplacement ou de pression sélective en conséquence à une antibiothérapie.

Il est vrai que l'utilisation des antibiotiques pourrait aboutir à l'élimination des *E. coli* intestinales sensibles, mais considérant le nombre très élevé d'*E. coli* commensales par rapport aux pathogènes dans le tube digestif, la probabilité d'une réémergence de souches résistantes parmi le reliquat de commensaux est plus élevée que celle des pathogènes naturellement moins nombreux dans l'intestin [200].

CHAPITRE 5

PARTIE EXPÉRIMENTALE

5.1. Problématique :

La colibacillose aviaire est l'une des infections bactériennes les plus fréquentes chez la volaille. Elle est responsable de pertes économiques majeures en Algérie et partout dans le monde. De plus, elle représente la première cause de traitement antibiotique augmentant les risques d'émergence de la résistance.

Cette maladie est due à des types particuliers d'*Escherichia coli* nommés Avian Pathogenic *E. coli* ou APEC. Ces dernières appartiennent à des sérogroupes particuliers dont les plus fréquents sont O1, O2 et O78. Aussi, elles sont caractérisées par leur possession de nombreux facteurs de virulence qui leur confèrent une pathogénicité et une capacité de survie dans l'hôte comme les adhésines (fimbriaires ou afimbriaires), la résistance à l'activité bactéricide du complément ou résistance au sérum et les toxines. Ces bactéries peuvent également être porteuses de plusieurs gènes spécifiques des *Escherichia coli* intestinales.

Le sérotypage était considéré comme la technique de référence pour la classification des APEC. Cependant, cette technique est limitée par l'existence de plusieurs souches non sérotypables. De plus, les sérogroupes présentent un polymorphisme aussi bien sur le plan génotypique que phénotypique.

L'identification moléculaire par la recherche des facteurs de virulence semble être la plus adaptée pour leur caractérisation.

En Algérie peu de données sur la caractérisation moléculaire des APEC sont disponibles. Les études faites jusqu'à ce jour se sont focalisées principalement sur la caractérisation phénotypique des APEC par sérotypage. De plus, peu de données existent sur la relation de ces facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques.

5.2. Objectifs:

Les objectifs de cette étude sont :

- Isolement et identification des souches d'*Escherichia coli* à partir des prélèvements d'organes (foie, poumon, cœur) d'animaux atteints de colibacillose et des matières fécales de poulets présumés sains.
- Description des lésions histopathologiques observées au niveau des organes chez les sujets atteints de colibacillose.
- Recherche des facteurs de virulence spécifiques des APEC des souches isolées des cas de colibacillose chez le poulet de chair et des souches isolées des matières fécales de poulets présumés sains.
- Recherche du potentiel diarrhéique des ces souches chez l'Homme par la recherche de certains facteurs de virulence associés aux souches d'*E. coli* diarrhéiques.
- Évaluation de la fréquence de résistance aux antibiotiques de ces souches.

5.3. Matériel et méthodes :

5.3.1 Matériel: (ANNEXE B)

5.3.2. Méthodes:

5.3.2.1. Méthodologie et région d'étude:

L'étude a été réalisée au niveau de 4 wilayates : Bouira, Boumerdes, M'sila et Tizi Ouzou. Le choix de ces wilayates était basé sur des raisons pratiques liées aux cabinets vétérinaires dont l'activité est principalement axée sur l'aviculture et l'acceptation des vétérinaires de nous réaliser les prélèvements recherchés. Au total 15 vétérinaires ont accepté de contribuer à cette étude.

5.3.2.2. Autopsie:

L'autopsie a été réalisée selon la procédure classique d'autopsie des volailles. Elle consiste à l'examen externe des cadavres, les incisions cutanées, l'ouverture des cavités (abdominale et thoracique), puis l'éviscération. Ces étapes

ont été suivies par l'examen macroscopique proprement dit des tissus et organes afin de détecter les éventuelles modifications lésionnelles.

5.3.2.3. Prélèvement des organes:

Les prélèvements sont réalisés sur des animaux récemment morts ou vivants sacrifiés présentant des signes ou des lésions de colibacillose. Les organes prélevés sont le foie, le cœur et le poumon. Les prélèvements ont été mis dans des flacons stériles codés par un numéro qui sont transportés dans une glacière isotherme jusqu'au laboratoire.

Pour les prélèvements destinés à l'examen histopathologique, les échantillons (foie, poumon, cœur) sont collectés puis placés dans les flacons contenant du formol à 10%. À cet effet, le volume du formol doit être 10 fois celui de l'échantillon.

Une fiche de renseignement destinée aux vétérinaires praticiens a été élaborée pour le recueil des informations lors des prélèvements (ANNEXE C).

Cette fiche comporte, la date et le numéro d'identification du prélèvement, le propriétaire de l'exploitation, la localité, l'effectif de l'élevage, l'âge des volailles, la morbidité et la mortalité, les symptômes et les lésions observés et enfin le traitement préconisé.

5.3.2.4. Prélèvement de fèces:

Les prélèvements de fèces ont été également réalisés sur des sujets sains (ne présentant pas de signes de colibacillose) soit par la récolte de matières fécales fraîches directement de la litière ou après défécation soit en utilisant des écouvillons cloacaux puis transportés au laboratoire dans une glacière isotherme.

5.3.2.5. Examen bactériologique:

Cette étape a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène intercommunal de Draa El Mizan (Tizi Ouzou).

Dès leur réception au laboratoire, les prélèvements sont enrichis dans un bouillon nutritif puis laissés à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Les prélèvements sont ensemencés ensuite sur gélose Mac Conkey ou BCP (gélose pourpre de bromocrésol) et laissés à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 heures.

Après 24 heures une ou deux colonies suspectes (colonie rouge ou rose sur milieu Mac Conkey, jaune sur BCP) sont ensemencées sur gélose nutritive inclinée et incubées pendant 24 heures à l'étuve puis conservées à température de réfrigération en attendant leur identification.

Les prélèvements ont fait l'objet ensuite d'une coloration de Gram, une recherche de l'oxydase et ensuite une identification à l'aide des galeries API 20E (Bio-Mérieux, France).

5.3.2.5.1. Identification à l'aide des galeries Api 20E:

5.3.2.5.1.1. Principe:

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs. Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries. Elle comprend 20 tests biochimiques.

5.3.2.5.1.2. Mode opératoire :

Les étapes d'identification bactérienne via les API 20E sont réalisées comme suit:

- Préparation d'une suspension bactérienne dense dans 5ml d'eau distillée stérile.
- préparation de la boîte d'incubation des galeries et remplissage des puits avec de l'eau distillée stérile.
- Introduction de la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette.
- Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule ;

- Pour les autres tests remplir uniquement les tubes (et non les cupules) ;
- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. - Refermer la boîte d'incubation ;
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.
- identification des souches bactériennes

5.3.2.6. Étude histologique:

Toutes ces manipulations sont réalisées au laboratoire d'histopathologie de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger (ENSVA). Ces techniques ont été réalisées selon les méthodes décrites par GABE [205].

5.3.2.6.1. Fixation:

Les organes (cœur, foie et poumon) ont été fixés dans une solution de formaldéhyde à 10% pour permettre la fixation du tissu. Cette fixation consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes lysosomiales cellulaires.

5.3.2.6.2. Inclusion en paraffine:

Les morceaux de tissus fixés au formaldéhyde sont placés en cassette histologique qui suivra des bains successifs de déshydratation et d'imprégnation de paraffine liquide à 60°C.

5.3.2.6.3. Post fixation (rinçage):

Les organes fixés sont retirés des pots du formol puis rincés avec de l'eau de robinet pendant au moins trois heures puis on fait des coupes de 3 à 6 fragments selon la taille de l'organe prélevé et on place ses fragments dans des cassettes en plastique.

On procède donc à une double substitution en remplaçant l'eau des tissus par l'alcool (déshydratation) puis l'alcool par le toluène dans lequel la paraffine est soluble. Les cassettes contenant les tissus sont passées dans différents bains : éthanol 70°, éthanol 80°, éthanol 90°, éthanol absolu, deux bains de toluène et

deux bains successifs de paraffine fondue à 60°C. Le cycle complet de cette étape dure environ 20 à 24 heures.

Dans l'étape d'inclusion, les cassettes sont récupérées et maintenues dans la paraffine fondue à 60°C avant être ouvertes pour placer les morceaux de tissus en bloc de paraffine qui fige à température ambiante. Les tissus sont placés sur leur tranche au fond d'un moule pour orienter le plan de coupe transversalement, puis figés dans la paraffine sur support cassette. Les moules sont ensuite placés pendant 48 à 72 h à température ambiante sur la paillasse.

5.3.2.6.4. Coupes histologiques:

Les blocs sont d'abord démoulés puis dégrossis après fixation de la cassette support sur le microtome. Le dégrossissage (plusieurs coupes de 10 µm) permet de dégager la paraffine en surface du bloc pour atteindre le tissu lors des coupes. Ensuite, des rubans de coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisés puis étalés par flottaison à la surface d'un bain marie à 37°C afin de déplisser la paraffine. Deux à trois coupes en ruban sont placées et collées (à l'aide d'une goutte d'eau gélatineuse) sur une lame de verre puis séchées dans une armoire ventilée, chauffante à 37°C pendant au moins 3 heures. Les lames séchées peuvent être conservées à température ambiante jusqu'à la coloration.

5.3.2.6.5. Coloration:

Dans le but de caractériser l'architecture tissulaire une coloration des coupes de tissus à l'hémalum-éosine a été réalisée. Le principe de cette coloration repose sur la capacité de l'hémalum-éosine à colorer les compartiments cellulaires de manière différentielle en fonction de leur pH (des noyaux en bleu ou cytoplasme en rose). Les coupes séchées sur lames doivent être préalablement déparaffinées puis réhydratées avant la coloration. Pour cela, les différentes coupes de tissus ont été placées: 3 minutes dans le toluène, 2 minutes dans l'éthanol absolu, 2 minutes dans l'éthanol 95%, 2 minutes dans l'eau courante, 2 minutes dans l'hémalum de Meyer, 2 minutes dans l'eau courante, 1,5 minutes dans l'éosine-érythrosine, 30 secondes dans l'eau courante, 30 secondes dans l'éthanol 95%, 30 secondes dans l'éthanol absolu et 1 minute dans le toluène respectivement. Elles sont ensuite montées en résine sous couvre-lame, puis observées en microscopie optique avec capture d'images numériques.

5.3.2.7. Recherche des gènes de virulence:

5.3.2.7.1. Extraction de l'ADN bactérien:

Les cultures bactériennes primaires présentes sur la gélose nutritive ont été ensemencées dans le milieu LB (Lysogenic broth) 37°C pendant 18 à 20h.

Une colonie est ensuite mise en suspension dans 200 µl d'eau distillée stérile. La suspension bactérienne est ensuite chauffée dans un bain mari pendant 1 heure à 100°C. Après une centrifugation à 10000 tours/min pendant 5 minutes, le surnageant (contenant l'ADN bactérien) de chaque tube a été transféré dans un nouveau tube identifié et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour la réaction PCR.

5.3.2.7.2. Mise au point de la réaction PCR:

Deux techniques de PCR ont été utilisées dans cette étude :

Une PCR simple pour la recherche des gènes spécifiques des APEC (*hlyF*, *iroN*, *iss*, *ompT*, *fimC* et *iutA*) et une PCR multiplex pour recherche des gènes diarrhéiques des *E. coli* (*eae*, *stx*, *est*, *elt*, *ipaH* et *aggR*).

5.3.2.7.2.1. Recherche des gènes spécifiques des APEC:

La première étape a consisté à préparer la solution mère ou mix. Les tubes Eppendorf ont été préparés comme suit: 12,5 µl de mix Taq® Green mix (Promga) est déposée; 10,5 µl d'eau ultra pure, 0,5 µl d'amorces et 0,5 µl d'extrait d'ADN sont ajoutés. La solution est ensuite homogénéisée pour quelques secondes dans une centrifugeuse puis les tubes sont disposés dans le thermocycleur selon les cycles de température appropriés.

Le cycle consiste en une étape d'activation de 5 min. à 95°C, suivie de 35 cycles de 30 seconde à 95°C (dénaturation), 30 secondes entre 51 et 61°C (température de fusions variables) (Tableau 5.1) et 1 min. à 72°C (élongation).

Une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min permet de terminer la synthèse des brins inachevés [15].

Tableau 5.1. Amorces des gènes exprimant des facteurs de virulence spécifiques des APEC

Gène		sequences (3'-5')	Fusion (C°)	References
<i>hlyF</i>	For	GGCGATTTAGGCATTCCGATACTC	59	[15]
	Rev	ACGGGGATCGCTAGTTAAGGAG		
<i>Iron</i>	For	AAAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCCG	61	[15]
	Rev	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
<i>Iss</i>	For	AGCAACCCGAACCACTTGATG	57	[15]
	Rev	TAATAAGCATTGCCAGAGCGG		
<i>ompT</i>	For	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	57	[15]
	Rev	CCCGGGTCATAGTGTTTCATC		
<i>fimC</i>	For	GGAAATAACATTCTGCTTGC	51	[15]
	Rev	TTTGTTGCATCAAGAATACG		
<i>iutA</i>	For	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	61	[1]
	Rev	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		

5.3.2.7.2.2. Recherche des gènes des *E. coli* diarrhéiques:

Pour la recherche des gènes : *eae*, *stx*, *est*, *elt*, *ipaH* et *aggR*, une PCR multiplex a été utilisée comme décrite par Toma et al. (2003) [201].

La solution mère ou mix a été préparée comme suit: 12,5 µl de mix Taq® Green mix (Promega) est déposée dans des tubes Eppendorf; 10,5 µl d'eau ultra pure, 1 µl d'amorces et 1 µl d'extrait d'ADN sont ajoutés. La solution est ensuite homogénéisée pour quelques secondes dans une centrifugeuse puis les tubes sont disposés dans le thermocycleur selon les cycles de température appropriés.

Le cycle consiste en une étape d'activation de 5 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles de 30 secondes à 95°C (dénaturation), 30 secondes à 56°C (fusions) et 1min. à 72°C (élongation) et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min. (Tableau 5.2) [201].

Tableau 5.2. Amorces des gènes exprimant des facteurs de virulence spécifiques des *E. Coli* diarrhéiques [201]

Gène		sequences (3'-5')	Pathotype d' <i>E. coli</i>
<i>Eae</i>	For	CCCGAATTCGGCACAAAGCATAAGC	EPEC
	Rev	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	
<i>Stx</i>	For	GAGCGAAATAATTTATATGTG	EHEC
	Rev	TGATGATGGCAATTCAGTAT	
<i>Est</i>	For	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	ETEC
	Rev	CCTGATCCTCAAAAGAGAAAATTAC	
<i>Elt</i>	For	TCTCTATGTGCATACGGAGC	ETEC
	Rev	CCATACTGATTGCCGCAAT	
<i>ipaH</i>	For	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	EIEC
	Rev	GCCGCTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	
<i>aggR</i>	For	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	EAEC
	Rev	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	

5.3.2.7.3. Électrophorèse sur gel d'agarose:

Les produits de PCR obtenus sont vérifiés par migration électrophorétique en gel d'agarose. La migration est réalisée en déposant chaque produit de PCR dans un puits du gel d'agarose de concentration 1% en tampon TAE (40 mM Tris, 20 mM Acétate et 2 mM EDTA) sous une tension de 120 volts pendant 30 minutes. Le gel est révélé en présence du bromure d'éthidium (BET, agent intercalant d'ADN et fluorescent) sous lampe UV et est photographié.

5.3.2.7.3.1. Protocole de préparation du gel d'agarose:

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, 1g de poudre d'agarose est mélangée avec 100ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X.
- Le mélange est fondu au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent puis laissé refroidir.
- La solution de bromure d'éthidium BET (10 µl pour 100ml) est ajoutée en la mélangeant.

- Le gel est ensuite coulé dans le support du gel après avoir mis les peignes puis laisser refroidir jusqu'à solidification de gel.

5.2.1.2.7.3.2. Électrophorèse des produits d'amplification:

- Après polymérisation du gel les peignes sont retirés et le gel est déposé dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie avec le tampon TBE 0.5X (le gel doit être totalement émergé).

- 10 µl du DNA marqueur de poids moléculaire (100 Base-Paire Ladder) est déposé (dans le premier puits).

- 10 µl de l'ADN amplifié est déposé dans chaque puits laissant deux puits pour le témoin négatif et le témoin positif.

- Le couvercle est fermé et la cuve est branchée au générateur sous tension à 120 V pour une durée de migration d'environ 30 min.

- Une fois la migration finie, le gel est placé dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

5.3.2.8. Recherche de la résistance aux antibiotiques:

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 16 antibiotiques ont été déterminées en utilisant des microplaques à 96 puits contenant des concentrations croissantes d'antibiotique (Tianjin of Technology and Science Development Co, Ltd, China). Chaque microplaque permet la détermination de la CMI pour 8 antibiotiques.

L'*inoculum* a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures (du milieu TSB) dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland (dilution jusqu'à ce qu'on atteigne une concentration finale de 10^7 UFC/mL).

La suspension est ensuite diluée dans le bouillon Mueller-Hinton (MH), chaque inoculum est ensuite déposé dans les puits des microplaques (2 microplaques pour chaque souche) selon les recommandations du fabricant. Les microplaques sont ensuite déposées à l'étuve pendant 18 à 24H à 37°C. *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche de référence.

La CMI de: l'ampicilline (0.25-512 128 µg/mL), l'amoxicilline-acide clavulanique (0.25/0.12-512/256 µg/ mL), la tétracycline (0.25-512 129 µg/mL), la doxycycline (0.25-512 µg/mL), la gentamicine (0.25-512 µg/mL), le sulfaméthoxazole-triméthoprim (0.06/1,18-32/608 µg/mL), le ceftiofur (0.12-256 µg/mL), la ceftazidime (0.12-256 131 µg/mL), l'enrofloxacin (0.015-32 µg/mL), l'ofloxacin (0.03-64 µg/mL), le méropénème (0.03-64 132 µg/mL), le florfenicol (0.12-256 µg/mL) et le sulfisoxazole (0.25-512 µg/mL) a été déterminée selon les normes du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008, 2014) [202] [203].

Celle de la colistine (0.12-256 134 µg/ml) et la spectinomycine (0.25-512 µg/mL) a été déterminée selon les normes ECOFF (epidemiological cut-off) recommandées par le: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017) (<http://www.eucast.org>). Cependant pour le Mequindox (0.5-256 µg/ml), les souches avec des valeurs de MIC $\geq$ 64µg/mL ont été considérées comme résistantes [204].

Soulignant que la recherche des facteurs de virulence et l'antibiorésistance ont été réalisées au niveau du Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Animal Products, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Chine.

5.3.2.9. Étude statistique:

Nous avons calculé au premier temps la fréquence des facteurs de virulence et d'antibiorésistance chez les APEC et les AFEC.

Le test de Khi deux au seuil de signification $\alpha = 5 \%$ a été utilisé pour comparer leur fréquence chez les AFEC et les APEC. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Excel.

5.4. Résultats:

Au cours de notre étude 92 souches ont été isolées et confirmées comme *E. coli* grâce aux caractères biochimiques et au moyen des galeries API 20E. Ces dernières ont été isolées à partir d'organes (cœur, foie, poumon) d'animaux présentant des lésions caractéristiques de colibacillose présentés dans 6 cabinets vétérinaires répartis dans 4 Wilayates (Bouira, Boumerdes, M'sila et Tizi Ouzou). Ces lésions sont dominées par des péritonites, des hépatites, des péricardites et des aérosaculites (Figure 5.1).

Afin de comparer les résultats 32 AFEC ont été isolées de matières fécales ou d'écouvillons cloacaux d'animaux cliniquement sains dans 5 élevages de la wilaya de Tizi Ouzou.

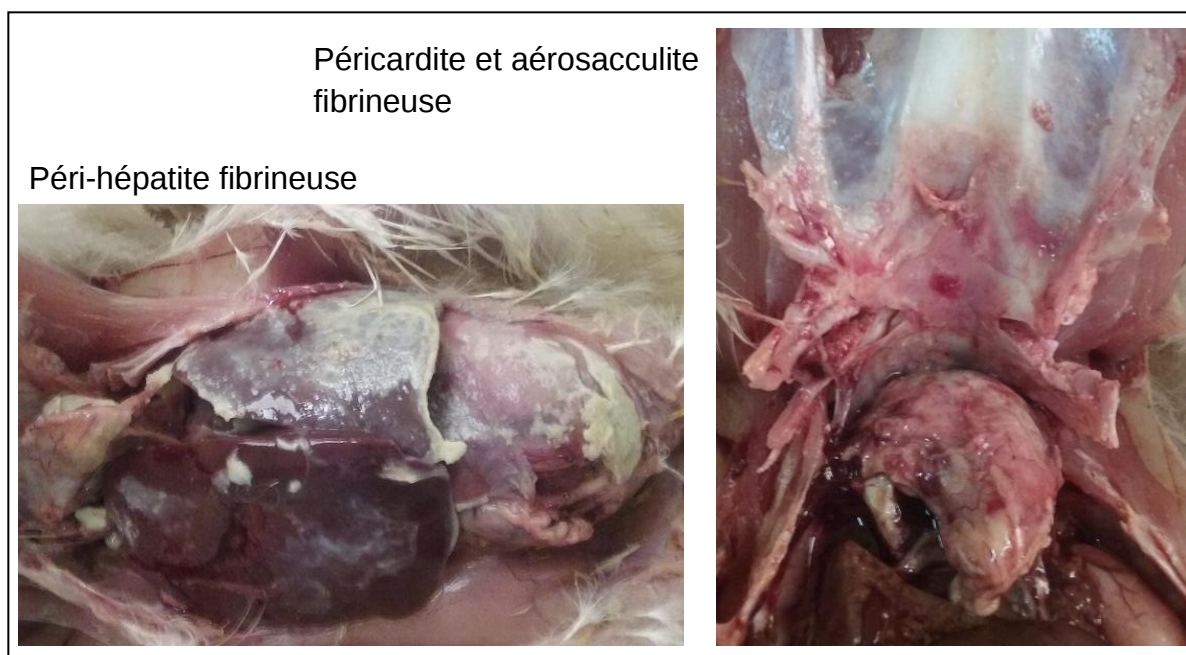


Figure 5.1: Poulet présentant des lésions caractéristiques de la colibacillose (LOUNIS, 2017)

5.4.1. Résultats histologiques:

L'examen histologique des fragments de foie, de cœur, et de poumons a permis de décrire certaines lésions microscopiques associées à la colibacillose.

Les lésions observées au niveau du foie sont une hépatite fibrineuse avec des infiltrations leucocytaires, des dégénérescences vacuolaires et des congestions intra et extravasculaire (Figure 5.2 & 5.3).

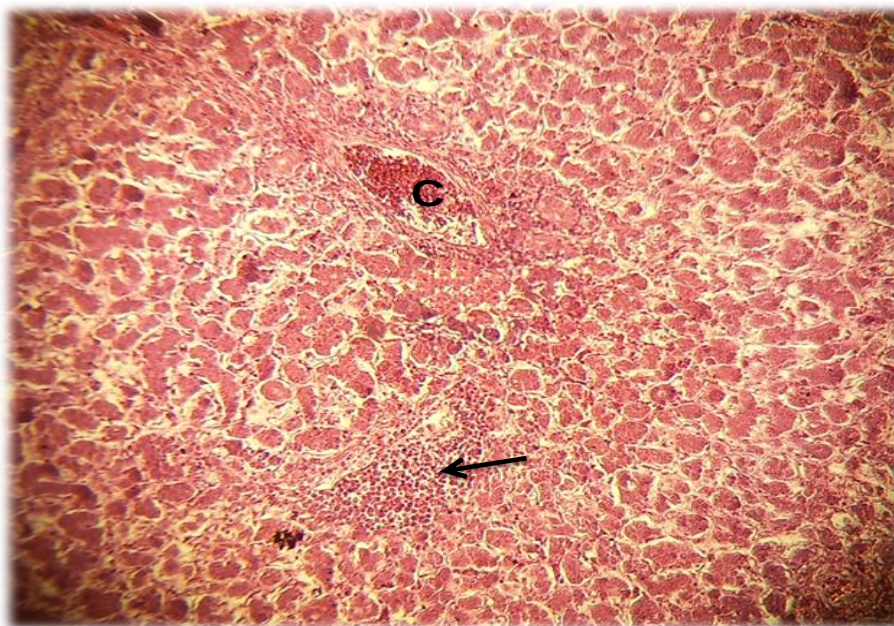


Figure 5.2: Infiltrations leucocytaires (Flèche) et congestion intravasculaire (C) au niveau du foie (X10).

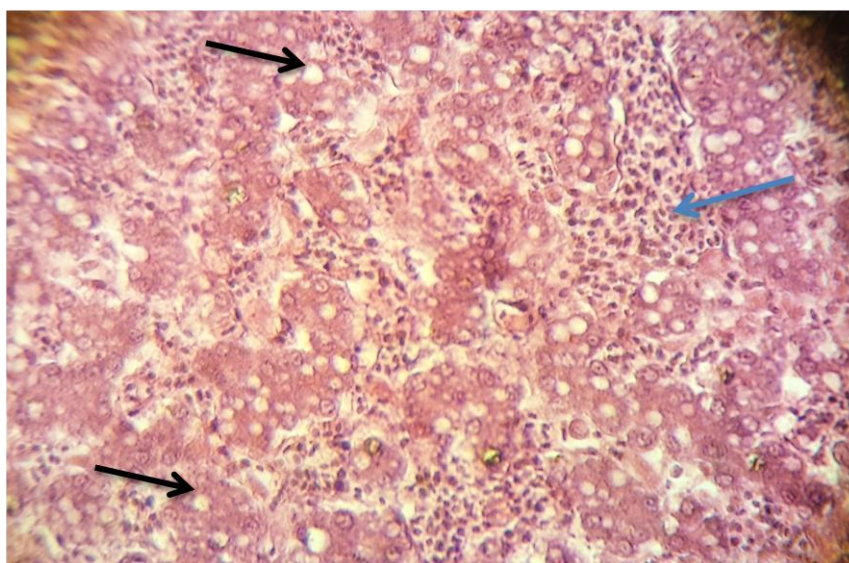


Figure 5.3: Infiltrations leucocytaires (flèche bleue) et dégénérescence vacuolaire (flèche noire) au niveau du foie (X10)

Au niveau du cœur, les lésions observées sont des péricardites fibrineuses et des inclusions leucocytaires (Figure 5.4 & 5.5).

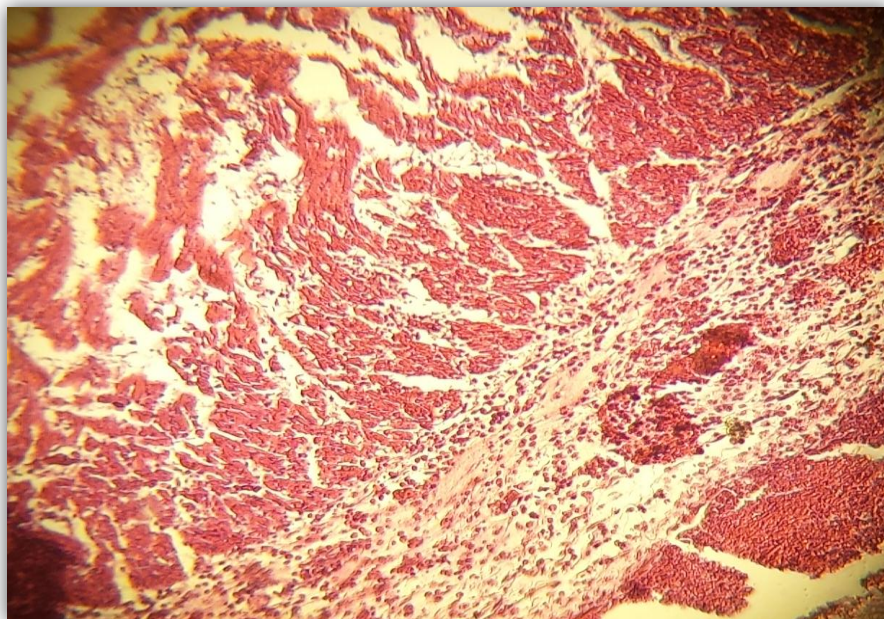


Figure 5.4: Péricardite avec infiltrations leucocytaires (X4)

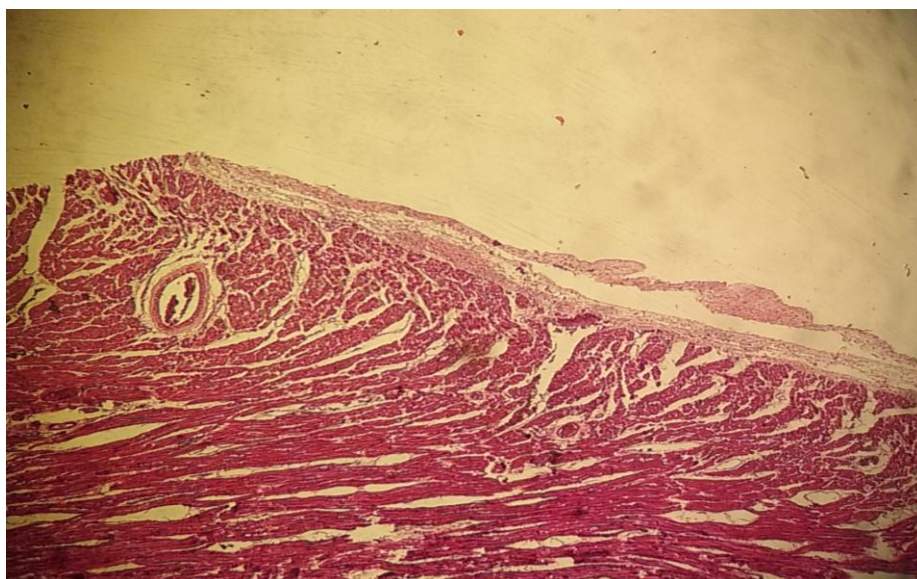


Figure 5.5: Péricardite fibrineuse (X4)

Les lésions observées au niveau des poumons sont une congestion vasculaire et des œdèmes perivasculaires et péribronchioliques (Figure 5.6 & 5.7).

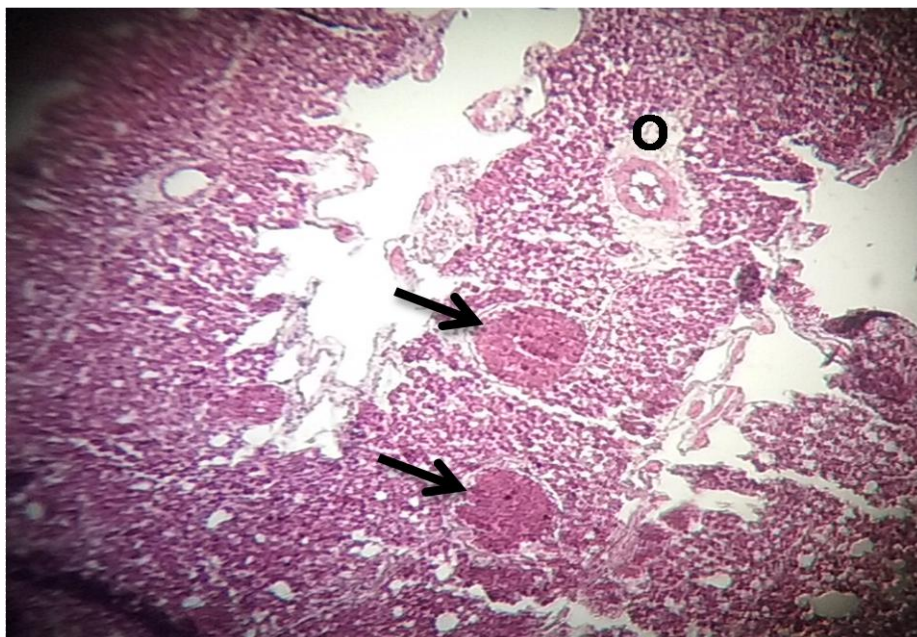


Figure.5.6: Lésions observées au niveau du poumon (X4)
 O : œdème périvasculaire, flèches : congestion vasculaire

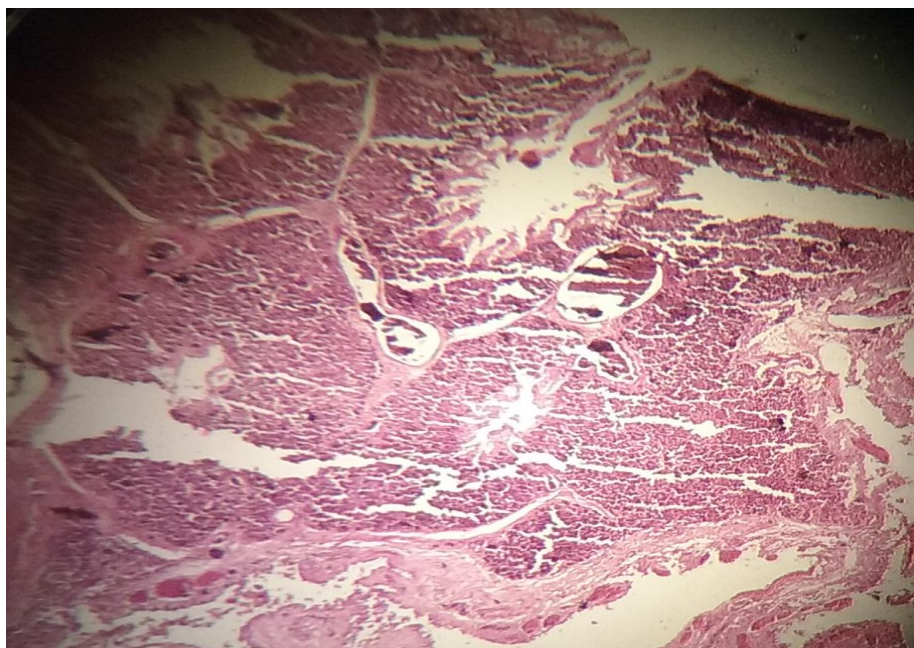


Figure.5.7: Péripleurésie et congestion vasculaire (X4)

5.4.2. Prévalence des gènes de virulence spécifiques des APEC:

Les 124 souches ont été testées pour la présence de 6 facteurs de virulence connus comme spécifiques des APEC (*hlyF*, *iroN*, *iss*, *ompT*, *fimC* et *iutA*) par PCR simple.

Les résultats de cette étude montrent que plus de 98% des souches testées possèdent au moins un de ces facteurs de virulence (2,2 % des APEC et 3,1% des AFEC ne possèdent aucun de ces gènes).

Les résultats montrent aussi que tous les gènes ont une prévalence entre 70,7% et 90,2% chez les APEC. Leurs taux chez les AFEC varient par contre, entre 46.9% et 78.1%.

Plus précisément, Les gènes codant pour le récepteur membranaire de l'aérobactine (*iutA*) (Figure 5.8) est le gène qui représente le taux le plus élevé chez les APEC (90,2%) et les AFEC (78,1%).

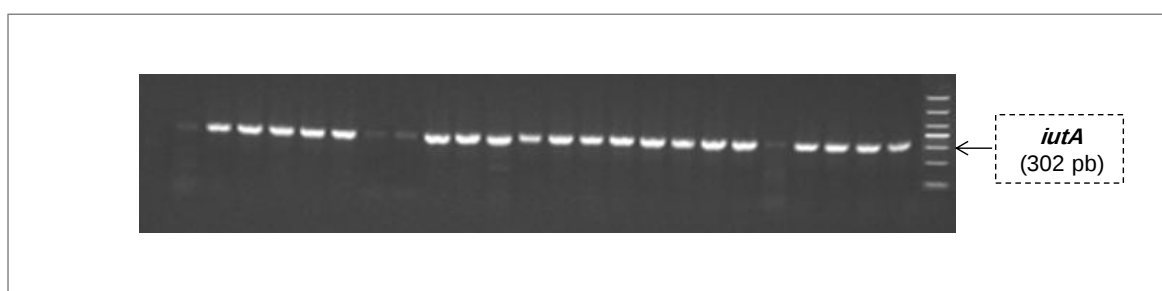


Figure 5.8: Résultats de la PCR pour le gène *iutA*

Le gène *FimC* (fimbriae de type I) est également le plus fréquent chez les AFEC (78,1%). Sa fréquence est par contre la plus basse chez les APEC (70,7%).

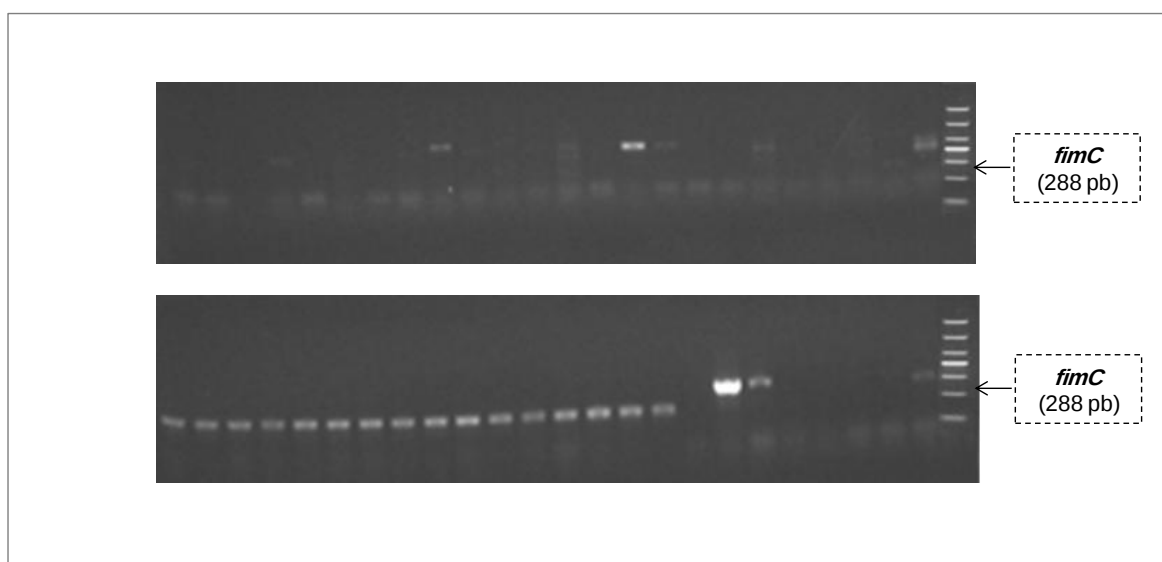


Figure 5.9: Résultats de la PCR pour le gène *fimC*

Notons que la différence entre la prévalence de ces deux gènes (*iutA* et *fimC*) chez les APEC et les AFEC est statistiquement non significative.

Le gène codant la résistance au sérum (*iss*) (Figure 5.10) est le gène le moins fréquent chez les AFEC (46,9%). Sa prévalence chez les APEC est de 85,9% avec une différence hautement significative ($p < 0.01$).

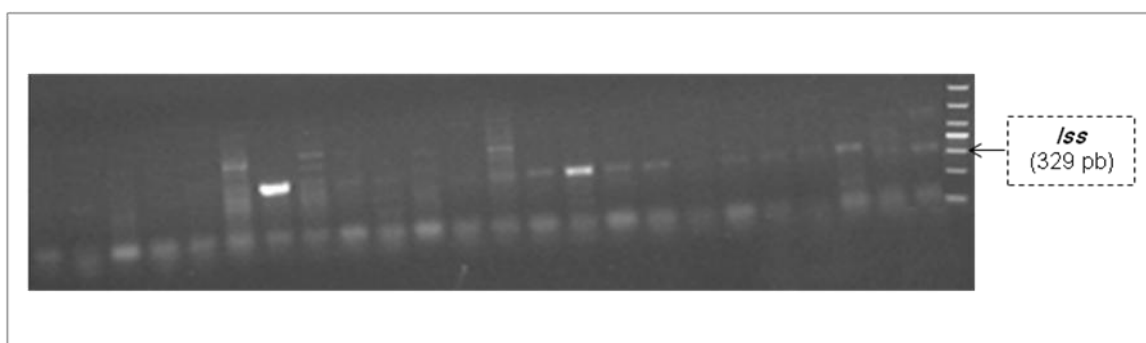


Figure 5.10: Résultats de la PCR pour le gène *iss*

Le gène *HlyF* (Figure 5.11) qui code pour une hémolysine montre également une différence très significative entre les APEC (82,6%) et les AFEC (59,4%) ($p < 0.01$).

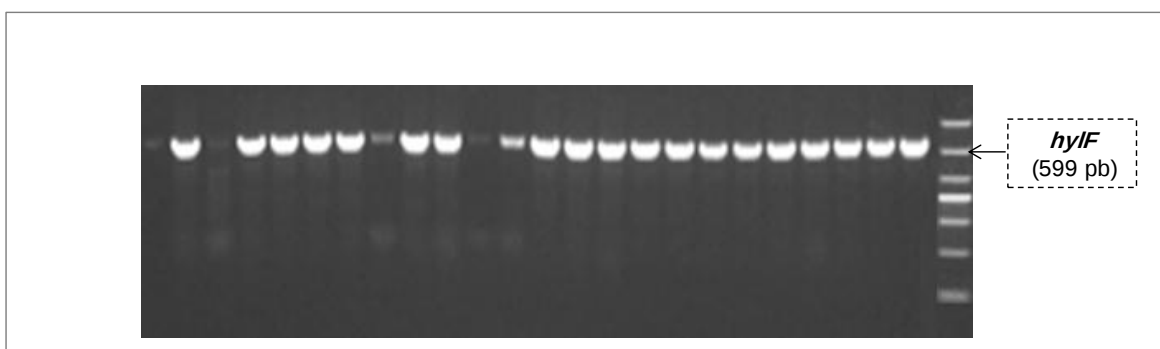


Figure 5.11: Résultats de la PCR pour le gène *hlyF*

Enfin, l'*iroN* (enterobactin N) (Figure 5.12) et l'*ompT* (outer membrane protein T) (Figure 5.13) ont également montré des prévalences statistiquement différentes chez les APEC (87% et 80,4%) et les AFEC (68,8% et 59,3% respectivement) (Tableau 5.3).

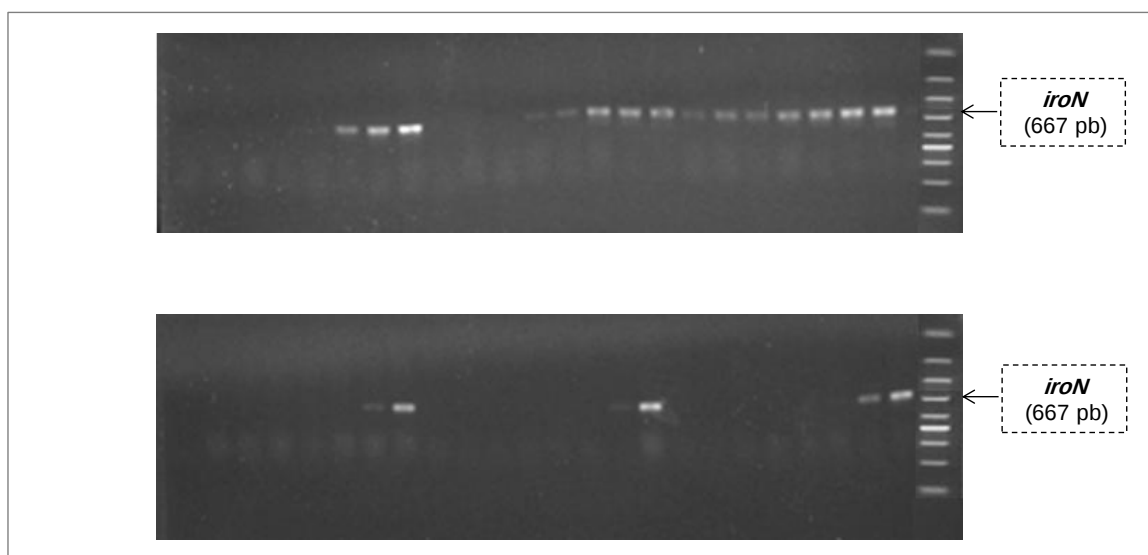


Figure 5.12: Résultats de la PCR pour le gène *iroN*

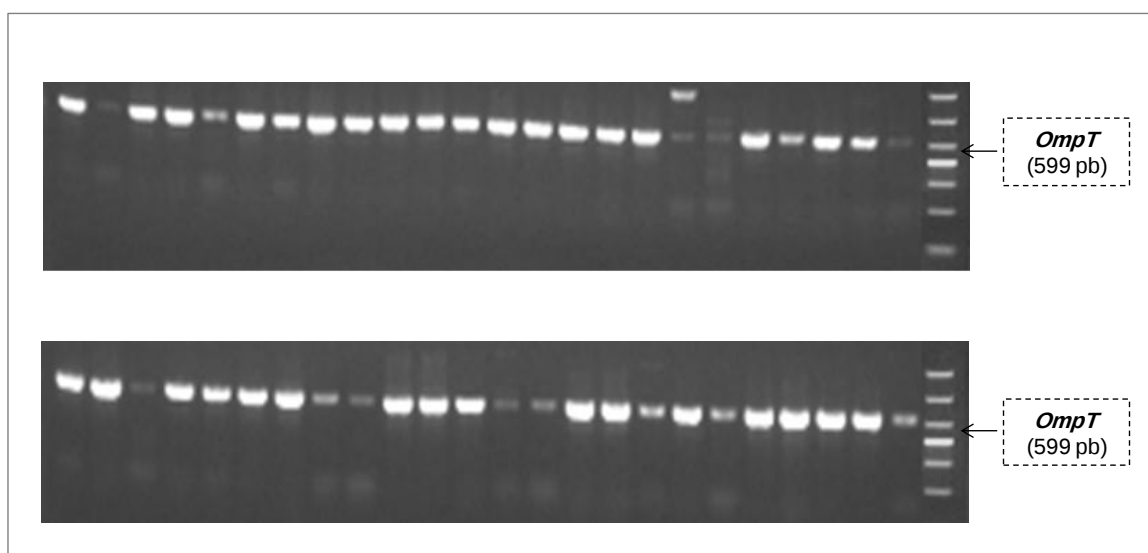


Figure 5.13: Résultats de la PCR pour le gène *ompT*

Tableau 5.3: Prévalence des gènes de virulence chez les APEC et les AFEC

Genes	APEC		AFEC	
	n	%	n	%
<i>iss</i>	79	85,9 ^{***}	15	46,9
<i>hlyF</i>	76	82,6 ^{***}	19	59,4
<i>ompT</i>	74	80,4 [*]	19	59,4
<i>iroN</i>	80	87 [*]	22	68,8
<i>fimC</i>	65	70,7	25	78,1
<i>iutA</i>	83	90,2	25	78,1

* p< 0,05, *** p<0,001

5.4.2.1. Association des gènes de virulence:

Les résultats montrent que la présence des 6 gènes dans une seule souche est significativement associée avec les APEC. en effet, 47,8% des APEC et 18,8% des AFEC possèdent les 6 gènes.

Les taux des souches qui portent 1, 2 et 4 gènes sont plus élevés chez les AFEC que chez les APEC (Tableau 5.4).

Tableau 5.4: Fréquence des souches selon le nombre de gènes de virulence

Nombre de gène	APEC		AFEC	
	Nombre	Pourcentage (%)	Nombre	Pourcentage (%)
6	44	47,8	6	18,8
5	25	27,2	7	21,9
4	11	11,9	8	25
3	5	5,4	0	0
2	4	4,3	4	12,5
1	1	1,0	4	12,5
0	2	2,2	1	3,1
Total	92	100	32	100

Différentes combinaisons ont été également testées; en effet, les résultats montrent que les combinaisons les plus fréquentes chez les APEC sont *iroN-iutA* (81,5%), *iroN-iss* (80,4%) et *iss-iutA* (78,3%) alors que les combinaisons les plus fréquentes chez les AFEC sont *iutA-fimC* (71,9%), *iutA-iroN* (62,5%) et *iroN-fimC* (62,5%).

Cependant, hormis l'association *fimC* avec les gènes *hylF*, *ironN* et *iutA*, toutes les autres combinaisons sont significativement associées aux APEC (Tableau 5.5).

Tableau 5.5: Pourcentage des associations des gènes de virulence chez les APEC et les AFEC

		<i>lss</i>	<i>hlyF</i>	<i>ompT</i>	<i>iroN</i>	<i>iutA</i>	<i>fimC</i>
APEC	<i>lss</i>	-					
	<i>hlyF</i>	73,9 ^{***}	-				
	<i>ompT</i>	72,8 ^{***}	69,6 [*]	-			
	<i>iroN</i>	80,4 ^{***}	76,1 [*]	72,8 [*]	-		
	<i>iutA</i>	78,3 ^{***}	76,1 [*]	75,0 [*]	81,5 [*]	-	
	<i>fimC</i>	75,0 [*]	72,8	70,7 [*]	76,1	76,1	-
AFEC	<i>lss</i>	-					
	<i>hlyF</i>	40,6	-				
	<i>ompT</i>	28,1	40,6	-			
	<i>iroN</i>	46,9	53,1	43,8	-		
	<i>iutA</i>	43,8	56,3	56,3	62,5	-	
	<i>fimC</i>	43,8	56,3	50,0	62,5	71,9	-
* p< 0,05, *** p<0,001							

5.4.3. Prévalence des facteurs diarrhéiques des *E. coli* :

Les souches isolées des organes des animaux atteints de colibacillose et des matières fécales des animaux cliniquement sains ont été testées pour la présence des certains gènes spécifiques des *E. coli* intestinales.

Les résultats d'analyse par PCR multiplex montrent qu'aucune souche ne possède les gènes *eae* et *AggR*. De plus les AFEC ne possèdent aucun des gènes recherchés (figure 5.14)

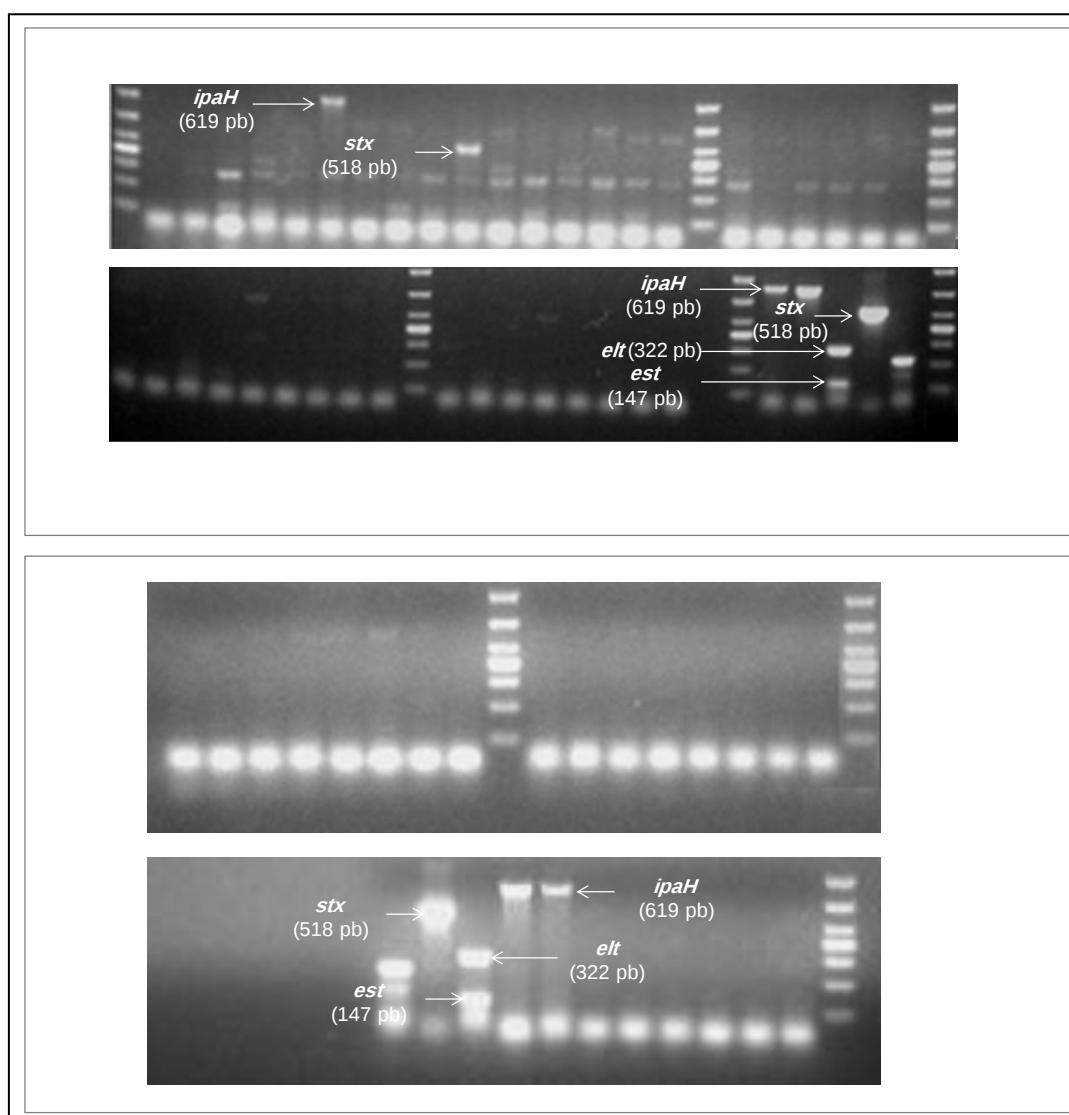


Figure 5.14: Résultats de PCR des gènes diarrhéiques

Parmi les 92 APEC testées, 9 (9,7%) souches possèdent au moins un gène; en effet 5 (5,4%) sont positives pour le gène *elt* et/ou *est*, 2 (2,1%) pour le gène *ipaH* et 2 (2,1%) pour le gène *stx* (Tableau 5.6)

Tableau 5.6: Prévalence des gènes diarrhéiques chez les APEC et les AFEC

Gènes	APEC		AFEC	
	n	%	n	%
<i>elt/est</i>	5	5,4	0	0
<i>stx</i>	2	2,1	0	0
<i>ipaH</i>	2	2,1	0	0
<i>eae</i>	0	0	0	0
<i>aggR</i>	0	0	0	0

5.4.4. Résultats de l'antibiorésistance:

5.4.4.1. Fréquence de susceptibilité et de résistance:

Cinquante trois souches APEC et quatorze AFEC ont été testées pour leur sensibilité vis-à-vis de seize antibiotiques. Les résultats montrent que toutes les souches sont résistantes à aux moins deux antibiotiques.

Les taux de résistance les plus élevés détectés chez les APEC ont été obtenus pour la tétracycline (98,1%), le sulfisoxazole (96,2%), le triméthoprim-sulfaméthoxazole (94,3%), l'ampicilline (92,5%), la doxycycline (90,6%), l'enrofloxacin (88,7%), l'ofloxacin (83%), la spectinomycine (67,9%) et le florfenicol (58,5%) (Figure 5.15).

La colistine (37,7%) et la gentamycine (32,1%) ont par contre, enregistré des taux de résistance moyens.

Enfin le ceftiofur (20,8%), le mequindox (17,9%), la ceftazidime (17%), le meropenème (9,4%) et l'amoxicilline/acide clavulanique (5,7%) semblent être les antibiotiques les plus efficaces contre les APEC (Figure 5.16)

En général, les résultats ont révélé des taux de résistance très proches chez les APEC et les AFEC.

Certains antibiotiques ont cependant, montré des taux plus élevés chez les APEC comme la doxycycline (APEC: 90,6%, AFEC: 78,6%), le sulfisoxazole (APEC: 96,2%, AFEC: 64,3%). D'autres par contre, sont plus résistants chez les AFEC comme la spectinomycine (APEC: 67,9%, AFEC: 85,7%), la colistine (APEC: 37,7%, AFEC: 57,1%), le mequindox (APEC: 17 %, AFEC: 42,9%) et l'amoxicilline/acide clavulanique (APEC: 5,7%, AFEC: 28,6%) (Figure 5.17).

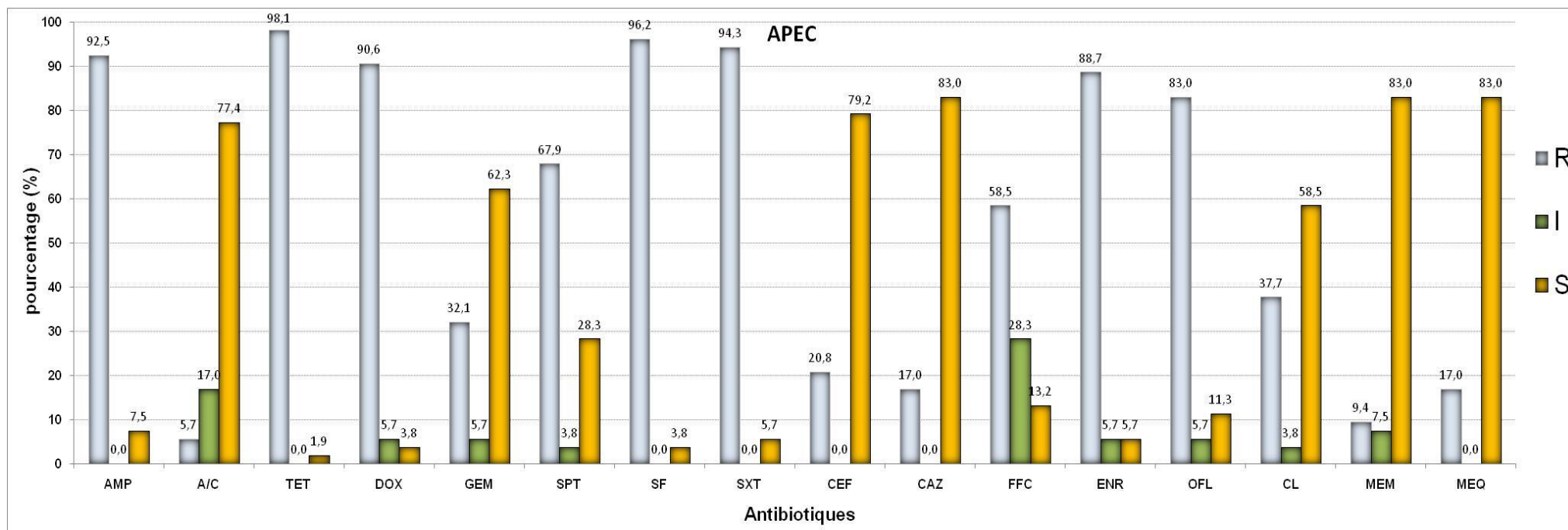


Figure 5.15: Fréquence de susceptibilité et de résistance aux antibiotiques chez les APEC

AMP : ampicilline, A/C : amoxicilline+acide clavulanique, TET : tétracycline, DOX : Doxycétine, GEM : gentamycine, SPT : spectinomycine, SF : sulfisoxazole, SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprim, CEF : ceftiofur, CAZ : ceftazidime, FFC : florfenicol, ENR : enrofloxacin, OFL: ofloxacin, CL : colistin, MEM : méropénème, MEQ: mequindox.

I : intermédiaire, S : sensible, R : résistante

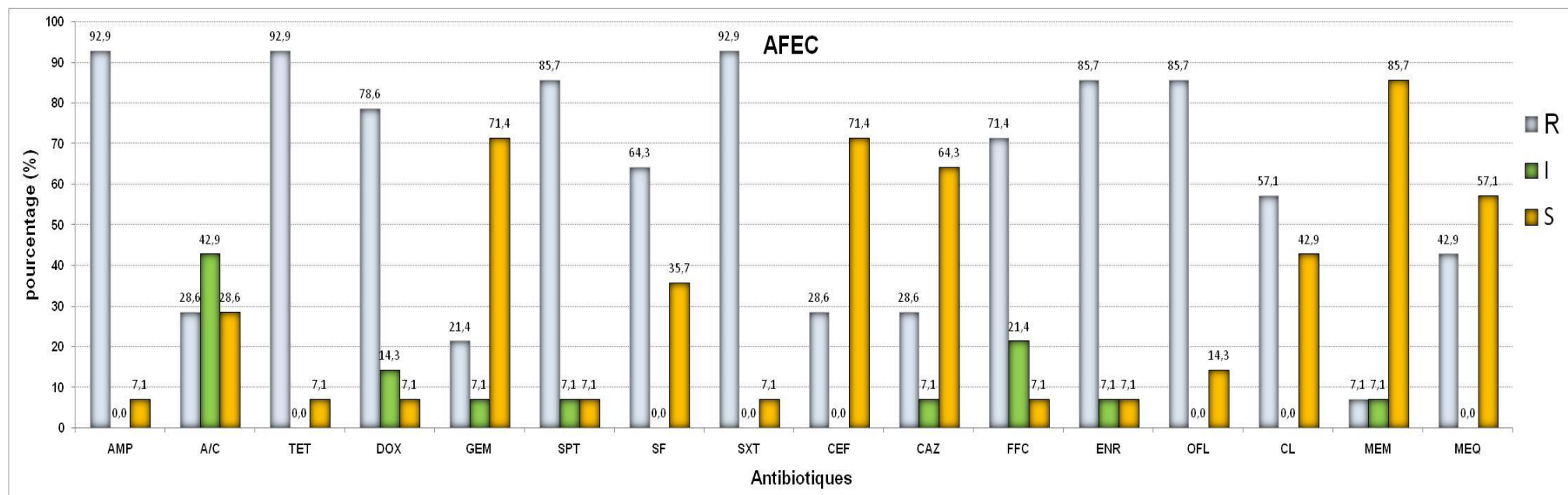


Figure 5.16: Fréquence de susceptibilité et de résistance aux antibiotiques chez les AFEC

AMP : ampicilline, A/C : amoxicilline+acide clavulanique, TET : tétracycline, DOX : Doxytétracycline, GEM : gentamycine, SPT : spectinomycine, SF : sulfisoxazole, SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprine, CEF : ceftiofur, CAZ : ceftazidime, FFC : florfenicol, ENR : enrofloxacin, OFL: ofloxacin, CL : colistine, MEM : méropénème, MEQ: mequindox.

I : intermédiaire, S : sensible, R : résistante

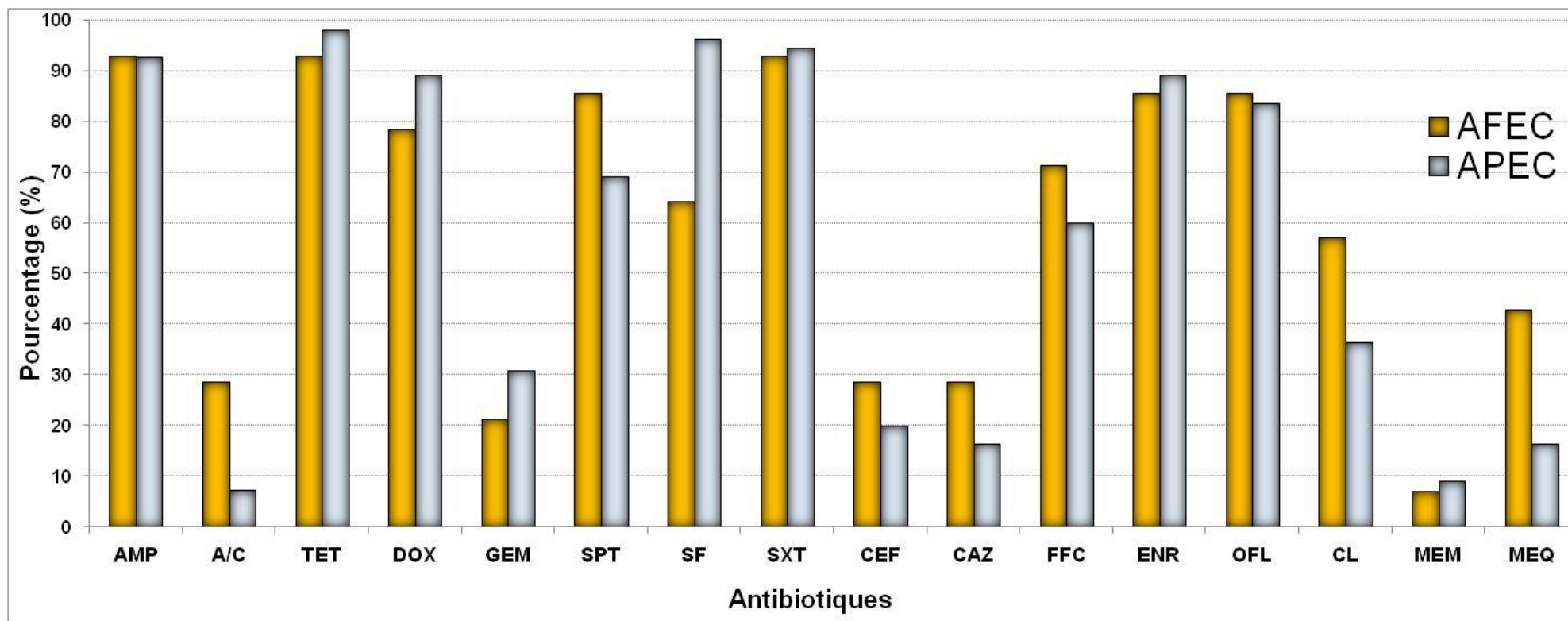


Figure 5.17: Fréquence de résistance aux antibiotiques chez les APEC et les AFEC

AMP : ampicilline, A/C : amoxicilline+acide clavulanique, TET : tétracycline, DOX : Doxycycline, GEM : gentamycine, SPT : spectinomycine, SF : sulfisoxazole, SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprim, CEF : ceftiofur, CAZ : ceftazidime, FFC : florfenicol, ENR : enrofloxacin, OFL: ofloxacin, CL : colistin, MEM : méropénème, MEQ: mequinolox.

I : intermédiaire, S : sensible, R : résistante

5.4.4.2. Fréquence de la multirésistance:

Les résultats de cette étude montrent que toutes les souches sont résistantes à au moins deux antibiotiques. De plus 19,4% des souches sont résistantes 7 et 9 antibiotiques alors 13,4% sont résistantes à 8 et 10 antibiotiques. Plus de 25% des souches sont résistantes à un nombre allant de 11 à 15 antibiotiques (Figure 5.18)

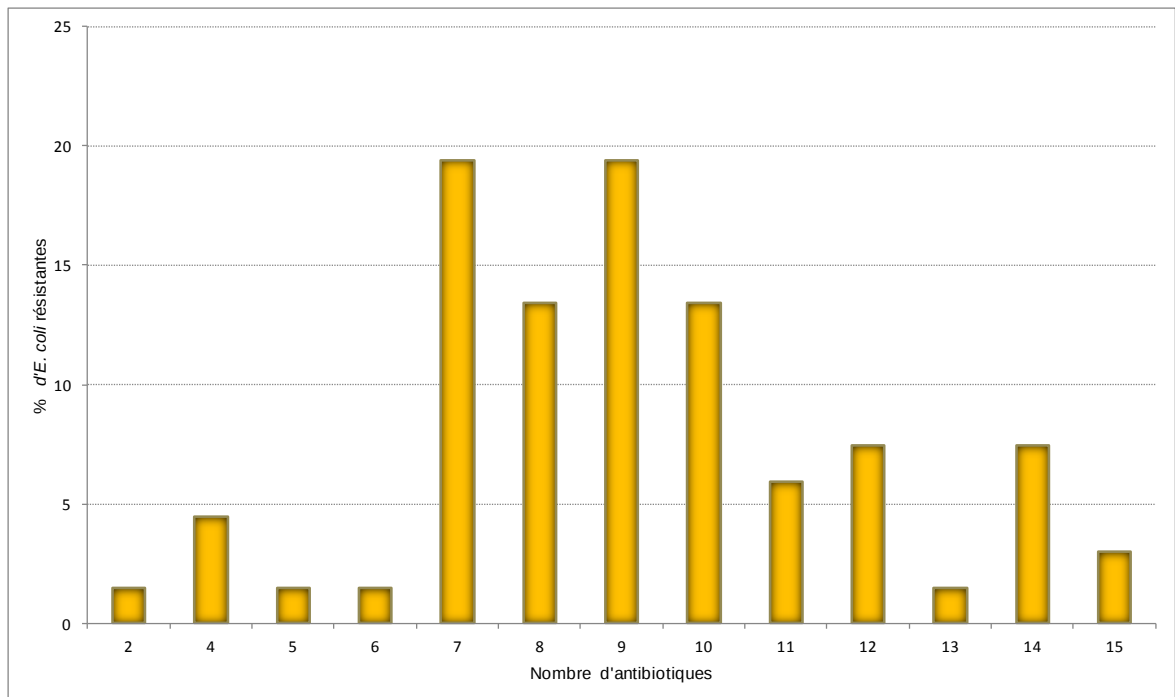


Figure 5.18: Fréquence de la multirésistance chez les *E. coli* testées.

5.4.4.3. Association entre les facteurs de virulence et l'antibiorésistance:

Les résultats de cette étude ont montré qu'hormis quelques exceptions les souches possédant plus de gènes de virulence sont les souches les plus résistantes. En effet, les souches qui portent les 5 gènes en commun sont en général plus résistantes à celles qui possèdent moins de 5 gènes (Figure 5.19).

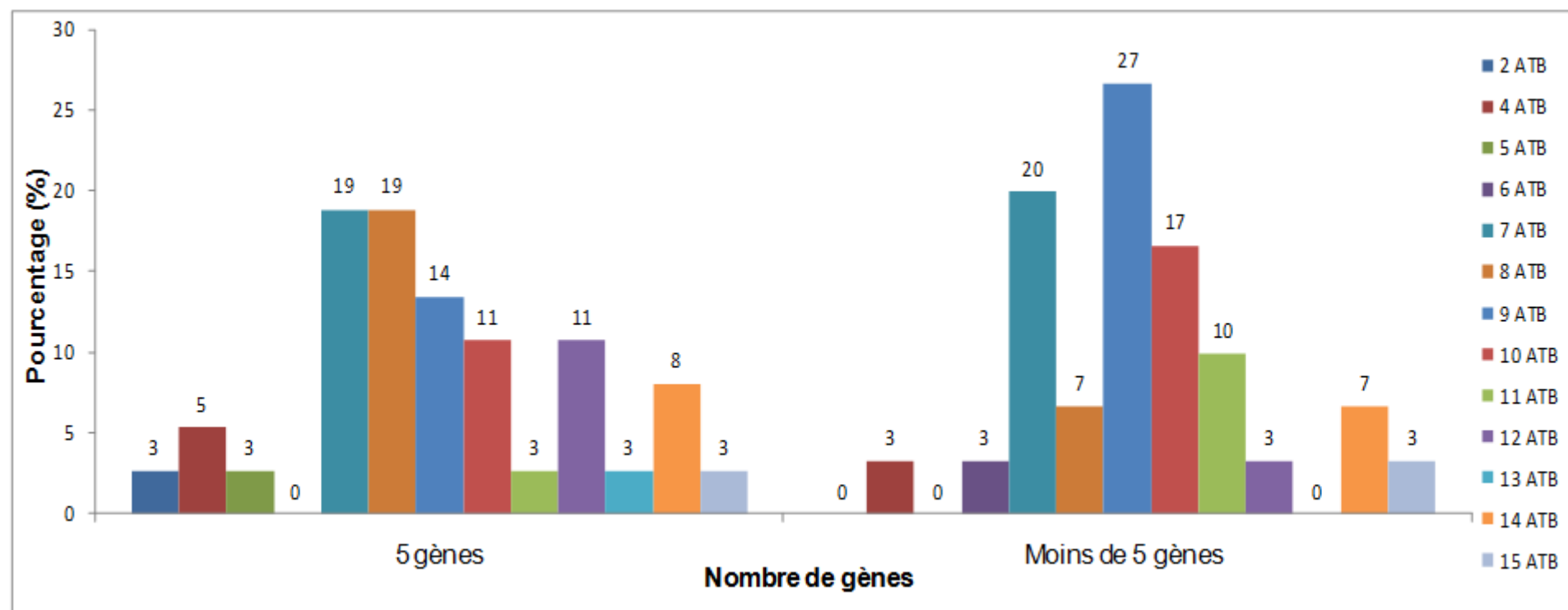


Figure 5.19: Association entre les facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques

5.5. Discussion:

5.5.1. Étude histologique:

Une étude histologique a été effectuée afin de décrire les lésions microscopiques observées lors de la colibacillose.

Les lésions observées au niveau du foie sont caractérisées essentiellement par une hépatite fibrineuse avec des infiltrations leucocytaires, des dégénérescences vacuolaires des hépatocytes et des congestions intra et extra-vasculaires. Ces lésions ont été déjà décrites chez le poulet et le pigeon [289] [270] [271] [272] [273] [274]. Des lésions de nécrose et des hémorragies ont été également observées [270] [275]. La dégénérescence et la nécrose des hépatocytes seraient probablement dues à la réaction de détoxification et l'excrétion des endotoxines secrétées par les APEC et à l'hypoxie tissulaire suite à l'atteinte vasculaire [270] [275].

Au niveau du cœur, les lésions observées sont des péricardites fibrineuses, des congestions et des inclusions leucocytaires. Ces lésions associées à des dégénérescences des fibres cardiaques et d'épaississement du péricarde sont les principales lésions décrites lors de la colibacillose [269] [271] [272] [276].

Les lésions observées au niveau des poumons dans cette étude sont une congestion vasculaire et des œdèmes perivasculaires et péribronchioliques. Des œdèmes, des hémorragies péribronchioliques, des hémorragies perivasculaires et parabronchiales et des infiltrations des hétérophiles et des mononucléaires ont été déjà décrits chez le poulet et le pigeon [270] [271] [272] [275] [276].

Les travaux de KAPAKIN et al, (2015) [277] ont montré que les lésions d'apoptose sont également associées à l'infection colibacillaire chez la poule pondeuse [277]. Des lésions d'apoptose des macrophages et des inflammations ont été également décrites lors de l'infection intra-trachéale de poulet par les APEC et les AFEC [278].

5.5.2. Quant est t-il des facteurs de virulence?

Nos travaux sont les premiers en Algérie décrivant la prévalence de certains facteurs de virulence chez les APEC et les AFEC issus du poulet de chair. Dans cette étude, 92 souches présumés APEC et 32 souches AFEC ont été

testées pour la présence de 6 gènes de virulence souvent impliqués dans la pathogénicité des APEC à savoir les gènes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* et *ompT* communément utilisés dans le diagnostic des APEC en plus du gène *fimC*.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que 98% des souches analysées possèdent au moins un des gènes de virulence testés. Autrement dit, deux souches présumées APEC et une souche AFEC ne possèdent aucun des facteurs de virulence recherchés.

5.5.2.1. Comment se placent nos résultats par rapport aux recherches Internationales?

5.5.2.1.1. *iutA*:

Selon nos résultats, le gène *iutA* représente le gène le plus fréquemment rencontré chez les APEC (90.2%). Il s'agit d'un gène faisant partie de l'opéron aérobactine. *iutA* est généralement plasmidique mais peut être parfois chromosomique [2] [11] [13]. Ce gène est impliqué dans la persistance et la généralisation de lésions APEC induites chez les poulets [95].

Par ailleurs, la prévalence du gène *iutA* chez les souches APEC est très controversée dans la littérature. Plusieurs travaux avaient décrit des prévalences élevées de ce gène de l'ordre de 80% et sont en adéquation avec nos résultats [2] [14] [95] [123] [137] [206] [207]. Cependant, d'autres études ont rapporté des pourcentages plus bas allant de 43% à 64% [18] [104] [134] [163] [208] [209] [210]. En outre, des travaux réalisés sur 40 souches APEC isolées en Egypte ont décrit une faible prévalence du gène *iutA* [211].

iutA constitue également un des gènes les plus répondus parmi les souches AFEC analysées (78,1%). Ceci a été également rapporté [137] [212]. Néanmoins, d'autres travaux avaient évoqués des taux plus bas variant entre 12% et 46% [2] [16] [18] [136] [123] [212] [213] [214].

Bien qu'*iutA* soit largement répondu parmi les AFEC analysées, sa présence est généralement associée à la colibacillose. Des travaux ont montré qu'il existe une différence significative entre les AFEC isolées à partir d'écouvillons cloacaux chez des poules atteintes de colibacillose et chez des poules saines pour le gène *iutA* [107].

5.5.2.1.2. *ompT*:

Comme pour le gène *iutA*, presque 80% des souches APEC testées sont positives pour le gène *ompT*. Ce gène code pour une enzyme membranaire pouvant inactiver certains peptides antimicrobiens et est impliquée dans la pathogénicité de *E coli*. En effet, le taux retrouvé dans cette étude est similaire à ceux retrouvés dans d'autres études réalisées sur des APEC un peu partout dans le monde [7] [14] [211] [212] [215]. Toutefois, des travaux réalisés en 2015 ont décrit des prévalences environ 20 fois inférieures [95] [163].

D'autre part, la prévalence du gène *ompT* est également haute chez nos AFEC (59%). Ces résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature notamment les travaux de MOHSENFARD et al, (2016) [137] et Hussein et al, (2013) [123] évoquant des taux de 61% et 53% respectivement [123] [137]. D'autres études datant de 2013 et de 2016 avaient décrit des taux n'excédant pas les 50% [15] [212] [213] [214].

5.5.2.1.3. *hlyF*:

En ce qui concerne le gène *hlyF*, impliqué dans l'utilisation du fer de l'hôte, le taux obtenu chez les APEC est de 82,6%. Ces résultats sont complètement compatibles avec d'autres résultats déjà publiés [5] [13] [14] [211] [212]. D'autres auteurs ont décrit une prévalence moyenne de 55% [80]. Des taux plus bas allant de 12,8% à 35,6% ont été rapportés par contre, par d'autres auteurs [95] [120] [163].

La prévalence obtenue chez les AFEC (59,4%) est proche des résultats de certaines études décrivant des taux allant de 49,4% à 60% [5] [16] [137] [214] alors que JOHNSON et al (2006) [13] et HIKI et al, (2016) [213] ont rapporté des taux plus bas de 27,1% et 28,2% respectivement [13] [213].

5.5.2.1.4. *iss*:

Curieusement, le gène *iss* est l'un des gènes le plus fréquent (85,8%) chez les APEC alors qu'il a la fréquence la plus basse (46%) chez les AFEC. Ceci est similaire à des résultats déjà publiés [5] [123]. Ces résultats démontrent l'importance de ce facteur dans l'identification des APEC. En effet, le gène *iss*

code pour une protéine qui joue un rôle dans la résistance au sérum et la protection contre l'action du complément et sa présence est importante chez les APEC [93].

5.5.2.1.5. *iroN* et *fimC*:

Dans le même sens, les gènes *iroN* et *fimC* ont été détectés avec des taux très élevés aussi bien chez les APEC (87% ; 70,7%) que chez les AFEC (68,8% et 78,1% respectivement). Ces résultats confirment les résultats décrits dans plusieurs travaux montrant que la majorité des APEC portent les gènes *iroN* et *fimC* [3] [14] [21] [32] [93] [102] [107] [141]. Ces deux facteurs sont impliqués dans les premières étapes de l'infection colibacillaire ce qui montrent que les AFEC ont aussi un potentiel de virulence quand les conditions sont réunies.

5.5.2.2. S'agit-il d'un bon moyen de diagnostic?

La combinaison "*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT*" est communément utilisée dans le diagnostic des APEC. Il s'agit d'un outil de diagnostic proposé par JONHSON et al, (2008) [14] décrit comme un moyen de distinction entre les APEC et les AFEC.

Dans le présent travail, 57,6% des APEC testées ont été positives pour cette combinaison. Même si nos résultats rejoignent ce qui a été anciennement évoqué dans la littérature notamment par DE CARLI et al, (2015) [7] (environ 59%), il ne faut pas négliger le fait que 43% des souches APEC analysées ne portent pas cette combinaison. Face à ces résultats, on peut s'interroger quant à la pertinence de ce moyen de diagnostic.

L'autre problème soulevé est celui des souches AFEC analysées. Bien que les AFEC utilisées dans cette étude soient isolées à partir de poulets visiblement sains, plus d'un quart d'entre eux sont porteurs de la combinaison "*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT*". Ces résultats incitent à poser 3 questions:

- S'agit-il vraiment de souches AFEC?
- Est ce que les poulets visiblement sains n'étaient pas malades?
- Est ce que c'est la bonne combinaison définissant clairement les APEC et les AFEC?

En effet, même si cette combinaison a obtenu l'approbation de la communauté scientifique mondiale, elle présente des limites d'utilisation remettant en question son usage comme outil de diagnostic des APEC. De plus, de grandes divergences ont été obtenues pour la prévalence de cette association de gène dans la même souche chez les APEC allant de 4.6% à plus de 90% [6] [14] [121] [123] [215].

Outre cette combinaison, une multitude de systèmes de classification a été proposé entre autre ceux de SCHOULER et al, (2012) [2] ainsi que JEONG et al, (2012) [15]. Cependant, aucune des combinaisons proposées ne permet à l'heure actuelle de dessiner un patron précis pour ce qu'on appelle APEC ou AFEC.

5.5.2.3. Les AFEC possèdent- elles un potentiel virulent?

La réponse peut être oui au moins en ce qui concerne la possession des facteurs de virulence. En sachant que les AFEC sont définies comme des *E. coli* non pathogènes faisant partie du microbiote intestinal, on pourrait supposer que ces bactéries sont totalement avirulentes [216]. Cependant, si on observe nos résultats de plus près, on s'aperçoit que 96% des AFEC analysés possèdent au moins un des facteurs de virulence testés. Plus précisément, 78% des AFEC sont positifs pour *iutA*, 59% pour *hlyF*, 46% pour *iss*, 68% pour *iroN* et 59% pour *ompT*. De plus, 71% des AFEC analysées contiennent la combinaison *iutA-FimC* et 62% contiennent la combinaison *iroN-iutA* ou *iroN-fimC*. Plus de 50% des AFEC possèdent une des combinaisons suivantes à savoir *ompT-fimC*, *hlyF-iroN*, *ompT-iutA*, *fimC-hlyF* et *iutA-hlyF*. On peut ainsi établir un parallèle avec d'autres travaux confirmant la présence de ces facteurs de virulence dans les souches AFEC [121] [212] [213] [216]. En s'appuyant sur les travaux de KEMMETT et al, (2014) [17] on pourrait imaginer un pouvoir pathogène de ces AFEC quand les conditions sont réunies [17].

Il est actuellement bien établi que certaines souches AFEC sont capables d'induire des pathologies chez l'Homme et chez certains mammifères. Dans le même sens, il a été également rapporté que certaines souches AFEC humaines contiennent les facteurs de virulence mentionnés ci-dessus [217]. Ces facteurs ont été également détectés chez des souches d'*E. coli* isolées d'effluents d'hôpitaux [218]. Nos résultats viennent supporter l'hypothèse de RASHKI et al,

(2016) [217] spéculant l'implication des déchets fécaux humains dans notre cas les déchets fécaux aviaires dans le schéma épidémiologique zoonotique des ExPEC.

5.5.3. Les souches *E. coli* aviaires possèdent t'elles d'autres facteurs de virulence atypiques?

5.5.3.1. Quant est- il des facteurs diarrhéiques humains?

Les APEC sont connues comme agents d'infections extra-intestinales chez la volaille. Cependant, certains d'entre eux peuvent porter certains facteurs de virulence spécifiques de certains pathotypes d'*E. coli* intestinales comme les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéro-invasives (EIEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) [1].

La recherche de ces facteurs a été faite selon la technique de TOMA et al, (2003) [201] permettant de classer les différents pathotypes grâce une PCR multiplex évaluant la prévalence des gènes diarrhéiques *eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH* et *aggR* [201]. Les résultats montrent qu'aucune souche AFEC ne porte l'un de ces gènes. De plus, les gènes *eae* et *aggR* n'ont pas été détectés chez les APEC. Ces résultats rejoignent ceux d'UNNO et al, (2011) [208] et SALEHI et GHANBARPOUR, (2010) [219] qui n'ont détecté aucun de ces gènes chez les *E. coli* isolées des matières fécales de poulets et de caille [208] [219].

Le gène *eae* a été recherché dans plusieurs travaux chez le poulet. C'est un facteur d'adhésion important des EPEC. Les taux obtenus ont montré une grande divergence. Certains auteurs ont obtenu un taux très bas (1,28%) [220]. RAMADAN et al, (2016) [25] ont montré que les 29 souches testées isolées à partir de poulets atteints de colibacillose étaient positives pour le gène *eae* [25].

KILIÇ et al, (2007) [221] et ZAKERI [24] ont obtenu des taux d'environ 48% pour le gène *eaeA* des souches isolées de cas de colibacillose alors qu' OH et al, (2012) [222] et SALEHI et al, (2007) [223] ont obtenu des taux de 12,4% 16,7% dans des souches isolées de matières fécales de poulets cliniquement sains et des cas de colibacillose respectivement [14] [221] [222] [223].

Cependant, les gènes *est/elt* et *ipaH* ont été décrits avec des taux très bas de 5,4% et 2,1% respectivement. Ces deux facteurs sont caractéristiques des ETEC et des EPEC [201]. Toutefois, JANSSEN et al, (2001) [102] et GHANBARPOUR et al, (2011) [224] n'ont pu détecter ces gènes chez les APEC [102] [102].

De plus, nos résultats montrent que 2,1% des APEC sont positives pour le gène *stx*. Ces résultats rejoignent ceux décrits des souches d'*E coli* isolées des matières fécales de poulet de chair en Algérie [225]. Cette prévalence est cependant plus faible à celles décrites par d'autres auteurs rapportant des taux allant de 23,8% à 83,3% [25] [144] [226]. D'autres, par contre, n'ont pas pu isoler ce gène des souches d'*E coli* des matières fécales de poulets sains ou d'organes d'animaux atteints de colibacillose [102] [220] [223] [227].

Bien qu'aucune des souches AFEC testées n'était positive pour les gènes diarrhéiques recherchés, une étude réalisée au Burkina Faso recherchant les mêmes gènes sur des prélèvements fécaux de poulets de chair a révélé la présence des pathotypes STEC, EPEC, ETEC, EAEC et EIEC avec des prévalence de 6%, 37%, 5%, 6% et 1% respectivement. Il est important de mentionner que les prélèvements de cette étude ont été réalisés au moment du découpage des carcasses avant la mise sur le marché. Lors de cette étude, KAGAMBÉGA et al, (2012) [228] ont prouvé la présence de ces pathotypes dans les fèces d'animaux destinés à la consommation humaine. Ceci leur a permis de supposer que les animaux destinés à la consommation humaine seraient d'éventuels réservoirs des *E. coli* pathogènes intestinaux conduisant à une contamination des viandes menaçant ainsi la santé humaine [228]. Si on tient compte de ce mode de réflexion, on pourrait imaginer que les APEC pourraient également constituer un risque pour la santé humaine.

Au bilan, ces résultats montrent que les APEC semblent être un type particulier d'*E coli* pathogène ayant un tropisme pour les volailles mais possèdent des traits de virulence qui leurs permettent de dépasser la barrière d'espèce et de constituer un risque zoonotique.

5.5.4. Quant est-il de l'antibiorésistance?

La résistance vis-à-vis de 16 antibiotiques a été testée pour 53 souches APEC et 14 AFEC. Nos résultats montrent que plus de 80% des APEC ont été résistantes envers la tétracycline, la doxycycline, le sulfisoxazole, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, l'enrofloxacin, l'ampicilline, et l'ofloxacin. Cependant, plus de 32 % et plus de 37% des APEC ont été résistantes à la gentamicine et à la colistine respectivement. Les antibiotiques, ceftazidime, ceftiofur, mequinolox, amoxicilline/acide clavulanique et méropénème semblent être les antibiotiques les plus efficaces en cas d'infection par les APEC.

5.5.4.1. Tétracyclines:

Les résultats montrent que les tétracyclines [tétracycline (98,1%), doxycycline (90,6%)] sont les antibiotiques ayant les taux de résistance les plus élevés chez les APEC. Ces résultats rejoignent ceux déjà décrits en Algérie rapportant des taux de résistance très élevés allant 82% à 90,4% [164] [186] [229] [230] [231] [232] [233].

Ces observations sont également en accord avec les résultats publiés dans d'autres pays arabes à savoir le Maroc [181], l'Égypte [6] [207] [234] [235] et le Soudan [238]. Les mêmes résultats ont été également décrits dans certains pays Africains tels que l'Éthiopie [238] et le Zimbabwe [238]. Ces taux ont été également confirmés en Europe [155] [215] [239] [240]. En Asie, l'Iran, la Chine et la Corée du sud présentent également des taux de résistance similaires à nos résultats [154] [162] [169] [170] [189] [241] [242] [243] [244] [245] [246]. Ceci est également plausible pour des pays du continent Américain comme les USA [247] décrivant des taux très élevés dépassant les 70% [247].

De même que nos résultats chez les AFEC, AMMAR et al, (2017) [248] et BENAMEUR et al, (2016) [171] ont également obtenu des taux dépassant les 90% chez des souches d'*E. coli* isolées des matières fécales de volailles. Ces résultats sont aussi en accord avec des résultats déjà décrits dans le monde [153] [249] [250] [251].

La résistance des *E. coli* aux tétracyclines est due principalement à la présence de plusieurs gènes codant des pompes à efflux dans les plus importants sont : *tetA*, *tetB* [154].

5.5.4.2. Sulfamides:

Comme pour les tétracyclines, les sulfamides ont montré également une résistance très haute chez les APEC, seuls (sulfisoxazole: 96,2%) ou en association (triméthoprim-sulfaméthoxazole: 94,3%). Ces résultats sont proches des taux décrits dans la région centre d'Algérie [231]. De même, des taux très élevés allant de 70 à plus 82% ont été décrits dans l'est et l'ouest Algérien [164] [230] [232] [233]. Les mêmes taux ont été également décrits chez des *E. coli* isolées de carcasse de poulet [186]. Des taux de résistance moyens ne dépassant pas les 42% ont été par contre décrits [229] [252].

Pour les AFEC, des taux très élevés ont été également décrits pour des souches d'*E. coli* isolées des matières fécales de poulets sains [171] [248].

Cette résistance très élevée pourrait être due à l'utilisation massive de cette association en pathologie aviaire, notamment pour le traitement non spécifique des coccidioses, et en parallèle contre les colibacilloses.

Sur le plan mondial, les résultats obtenus montrent en général des taux élevés allant de 55% à 67,6% au Maroc [181] [253], de 82% à 100% en Égypte [6] [207] [234], 80% en Éthiopie [250], 67% au Nigeria [254], de 58,6% à 94,3% en Iran [154] [242] [243] [255], 92% au Pakistan [256], de 66,1 à 91% en Chine [169] [245] [257] [258] [259] et 63% en Espagne [155].

La résistance à l'association triméthoprim-sulfamides est due à la présence de deux types de gènes qui sont les *sul* (*sul1*, *sul2*, *sul3*) et les *dhfr* codant pour des dihydroptérates synthétases et dihydrofolates réductases, des enzymes non inhibées par les sulfamides et la triméthoprim respectivement.

5.5.4.3. Quinolones:

Les quinolones de deuxième génération comme l'enrofloxacin et l'ofloxacin ont présenté des taux de 88,7% et 83% respectivement chez les APEC. Le taux obtenu pour l'enrofloxacin est proche de celui décrit par certains

auteurs en Algérie avec des taux élevés allant de 69 à 86, 3% [164] [231] [232] [233]. HAMMOUDI et AGGAD, (2008) [229] et AGGAD et al, (2010) [230] par contre, ont obtenu des taux très bas de 6% et 45% respectivement [229] [230].

Ce taux très élevé n'est pas surprenant sachant que l'enrofloxacin est utilisé à titre préventif dès les premiers jours dans les élevages du poulet de chair en Algérie [233].

Le taux de résistance à l'ofloxacin est également proche du taux rapporté par AGABOU et al, (2016) [185] en Algérie mais très élevé par rapport au taux de 26% rapporté par MEGUENNI, (2015) [252].

Les taux de résistance obtenus des souches des *E. coli* isolées des matières fécales en Algérie sont également élevés [171] [248] et sont proches de celui décrit dans notre étude pour l'enrofloxacin (85,7%).

Les taux de résistance pour l'enrofloxacin obtenus dans le monde montrent en général des fréquences plus faibles: 37% au Maroc [253], 20% en Égypte [235], 33,1 % au Brésil [260], 34,5% au Nigeria [251], de 7,5% à 42,7% en Iran [242] [255] [261], 15,8% en Inde [262], 29,4% au Jamaïque [250] et 0% au Pakistan [258].

Des taux plus élevés dépassant les 65% ont été par contre décrits au Maroc [181], en Iran [241] [243] [244], en Italie [239], en Roumanie [240], en Inde [263], en Chine [169] et en Corée [162] [264].

Les taux obtenus pour l'ofloxacin semblent être également plus faibles par rapport à nos résultats allant de 5 à 52% [155] [249] [253] [264] [265].

5.5.4.4. β -Lactamines:

En ce qui concerne les β -lactamines, nos résultats montrent une résistance très élevée vis-à-vis de l'ampicilline avec une moyenne de (92,7%). Ces taux vont dans le même sens avec les résultats de HALFAOUI et al, (2017) [231] et MESSAI et al, (2013) [232] et (2015) [164] décrivant des taux compris entre 80% et 89%.

D'une autre part, des taux moyens ont été décrits en Algérie. On cite surtout un taux de 60 % rapporté dans la région centre d'Algérie [252] et 49%

dans l'ouest Algérien [229]. Plus tard dans la même région aucune souche résistante à l'ampicilline n'a pu être détectée à partir de 100 souches d'APEC isolées de poulets atteints de colibacillose [230]. BOUDJERDA et al, (2016) ont obtenu un taux de 50% à partir des souches d'*E. coli* isolées de carcasses de volaille [267].

Dans notre étude, La résistance envers l'association amoxicilline/acide clavulanique est très faible (7,7%). Sa résistance chez les AFEC est cependant un peu plus élevée (28,6%). Ces taux vont de même avec les résultats déjà rapportés en Algérie avec des taux allant de 0 à 43% [185] [186] [231] [248] [252] [267]. BENAMEUR et al, (2014) [233] et MESSAI et al, (2015) [164] par contre, ont rapporté des taux contradictoires dépassant les 92% [164] [233].

De même que l'association amoxicilline/acide clavulanique, le meropenème semblent être très efficace contre les *E. coli*. En effet le taux de résistance est de 8,1%. Ces résultats rejoignent ceux déjà rapporté en Algérie décrivant un taux de susceptibilité de 100% pour le meropenème et l'imipenème [185] [186] [252].

Concernant les céphalosporines, les résultats obtenus pour la ceftazidime (22,8%) sont supérieurs à ceux de MÉGUENNI, (2016) [252] décrivant un taux un peu plus bas de 9% et AGABOU et al, (2016) [185] et LAAREM et al, (2017) [186] qui n'ont détecté aucune souche résistante [185] [186] [252].

Pour le ceftiofur, les taux moyens obtenus (24,7%) sont plus bas par rapport à ceux décrit par AMMAR et al, (2017) [248] et BENAMEUR et al, (2014) [233] avec des taux de 41 et 62% respectivement [233] [248].

5.5.4.5. Phénicolés:

Pour les phénicolés, le taux de résistance au florfénicol est bizarrement parmi les plus élevés. Le taux est étonnamment plus élevé chez les AFEC (71,4%) que chez les APEC (58,6%). Ces taux apparaissent très élevés par rapport à ceux déjà décrit en Algérie pour le chloramphénicol chez les APEC et les AFEC avec des taux variant de 5 à 45% [164] [171] [231] [231] [233] [248] [267].

Ces taux élevés pourraient être dus soit à la persistance d'une résistance acquise soit à une résistance croisée ou à une utilisation illégale sachant que l'utilisation de ces antibiotiques est interdite en médecine vétérinaire.

5.5.4.6. Aminosides:

En ce qui concerne les aminosides, les taux de résistance varient de (26,8%) pour la gentamycine à (76,8%) pour la spectinomycine. Le taux obtenu pour cette dernière n'est pas surprenant même s'il est plus élevé chez les AFEC que les APEC sachant qu'elle représente l'un des antibiotiques de sa famille les plus employées en aviculture [268] même si sa résistance n'est pas recherchée en Algérie.

La résistance à la spectinomycine et à la streptomycine est du principalement à la présence des gènes *strA strB* et une cassette de gènes *aadA* (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA23*) codant pour une adényl-transférase [154]. Le gène *aadA* qui est le gène le plus important est localisé sur les intégrons de multirésistance principalement les intégrons de classe 1 et 2.

Le taux de résistance obtenu pour la gentamycine chez les APEC (32.1%) et les AFEC (21,1%) est par contre surprenant sachant que cette molécule n'est pas utilisée en médecine vétérinaire et est réservée uniquement à la médecine humaine. Ce taux dépasse de loin les ceux déjà rapporté en Algérie avec des fréquences ne dépassant pas les 7% [164] [171] [185] [186] [230] [231] [232] [233] [252] [267].

5.5.4.7. Colistine:

Pour la colistine le taux de résistance obtenu est de (47,4%) (APEC: 37,7%, AFEC: 57,1%). Même si le taux rapporté chez les APEC est proche de celui rapporté par BENAMEUR et al, (2014) [233] décrivant un pourcentage de 31,6%, ces taux sont par contre très élevés par rapport à ceux déjà décrits en Algérie avec des taux ne dépassant pas les 11% [164][229] [230] [231] [232] [252] [267].

De plus, d'autres auteurs ont remarqué que toutes les souches étaient sensibles à cet antibiotique [171] [185] [186].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de la présente étude nous a permis de décrire certaines données liées aux colibacilloses aviaires dans la région centre d'Algérie.

Sur le plan histopathologiques ces résultats ont confirmé la présence de certaines lésions microscopiques dont les principales sont des hépatites et des péricardites fibrineuses, des infiltrations leucocytaires, des congestions, des dégénérescences vacuolaires et des œdèmes perivasculaires et péribronchiolique

En ce qui concerne les facteurs de virulence, nos résultats ont révélé que 98% des souches analysées étaient positives pour au moins un des gènes testés avec une dominance du gène *iutA* chez les APEC et *FimC* chez les AFEC. La combinaison des facteurs de virulence *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA* a été souvent décrite comme moyen de diagnostic des APEC. Ici, nous avons montré que 57,6% des APEC analysées étaient porteuses de cette combinaison de gène. Bien que cette combinaison était beaucoup plus répondue chez les APEC comparés aux AFEC, la prévalence de cette signature moléculaire rencontrée chez ces souches définies comme non pathogène est non négligeable (25%). A l'issue de ces observations, nous confirmons l'absence d'une formule génétique précise permettant de définir clairement les pathotypes APEC et AFEC. Il serait, donc, nécessaire de continuer l'exploration en développant des méta-analyses dans le but de définir d'autres combinaisons géniques permettant de distinguer les souches APEC des souches AFEC.

Les gènes *eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH* et *aggR* connus comme souvent attribués aux différents pathotype d'*E. coli* pathogènes intestinales chez l'Homme. Ici, nous avons montré que malgré l'absence de ces gènes chez les souches AFEC, 5.4% des APEC ont été positif pour le gène *elt/est* et 2,1% pour les gènes *stx* ou *ipaH*. Ces résultats incitent à développer d'autres projets visant non seulement à rechercher les autres pathotypes des *E. coli* pathogènes intestinales notamment EIEC et EAEC parmi les APEC en Algérie mais aussi identifiant les éléments génétiques mobiles en l'occurrence les plasmides et les transposant à l'origine du transfert de ces gènes humains chez le poulet et les autres espèces de volaille.

Lors de ce travail, nous avons également établi que toutes les souches APEC explorées sont résistantes au moins à trois antibiotiques. Les taux les plus élevés sont détectés pour les tétracyclines, les sulfamides et l'enrofloxaciné alors que les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime, ceftiofur), le méquindox, l'amoxicilline/ acide clavulanique et le méropénème semblent être les antibiotiques les plus efficaces. Le fait marquant de ce travail reste par contre, le taux de résistance un peu élevé de la gentamycine et la colistine. Cependant, du fait de l'importance de l'antibiothérapie dans la lutte contre la colibacillose, ces explorations méritent d'être approfondies d'un point de vue moléculaire. En effet, il serait important de tenter de déterminer la prévalence des gènes responsables des résistances aux antibiotiques notamment les gènes *qnr* et *bla*. Il serait également très utile d'explorer le portage des plasmides codant pour les gènes de virulence comme les cassettes d'antibiorésistance chez les APEC comme chez les AFEC. En effet, la recherche de ces plasmides notamment PTJ100 et pCVM29188-146 est indispensable pour la compréhension des mécanismes d'acquisition et de l'évolution de la pathogénicité des souches APEC ainsi que pour l'évaluation du potentiel pathogène des AFEC.

APPENDICE A

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AEEC: *Escherichia coli* attachant-effaçant

AFEC : Avian faecal *Escherichia coli*

APEC : Avian pathogenic *Escherichia coli*

API : Appareillage et Procédé d'Identification

ARN : Acide ribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

BLSE : Bétalactamase à spectre élargi

CMI : Concentration minimale inhibitrice

E. coli: *Escherichia coli*

EAggEC: *Escherichia coli* entéroaggrégative

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasive

EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène

ETEC : *Escherichia coli* entérotoxinogène

ExPEC : Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*

LB: Lysogenic broth

LDC : Lysine décarboxylase

LEE : locus d'effacement de l'entérocyte

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Orthonitrophényl- β -galactoside

PCR : Polymerase chain reaction

TBE (Tris-Borate-EDTA)

TDA : Tryptophane désaminase

TSB : Trypticase Soy Broth

Ufc : Unité formant colonie

UPEC : Urogenic pathogenic *Escherichia coli*

VP: Voges-Proskauer

APPENDICE B

MATERIEL NON BIOLOGIQUE UTILISÉ

Matériel utilisé pour la bactériologie:

- Tubes de prélèvement stériles, gants en latex, Bistouri, ciseaux, glacière isotherme
- Milieux de culture : Bouillon nutritif, gélose Mac Conkey, gélose nutritive.
- Violet de gentiane, lugol, alcool, fushine, lames, huile à émersion, eau oxygénée. - eau distillée stérile.
- Disques oxydase (Hi Media, India).
- Galeries biochimiques Api 20E (BioMérieux, France) pour l'identification des entérobactéries.
- Réactifs nécessaire pour les galeries api : Réactif de la TDA, JAMES (Kovacs), VP1 + VP2, NIT1+NIT2.
- Huile de paraffine (Vaseline).
- Logiciel d'identification des souches bactériennes.

Matériel et milieu d'extraction de l'ADN et de la PCR:

- Bouillon LB (Lysogenic Broth)
- Tubes de 1,5 ml, pipette,
- Centrifugeuse,
- Eau distillée,
- 12.5 µl of GO Taq® Green mix (Promga),
- Contrôles positifs
- Amorces : gènes de virulence
- Poudre d'agarose, TAE, marqueurs de taille, tampon de charge, bromure d'ethidium
- Bain marie
- Thermocyclur

Matériel et réactifs de l'électrophorèse:

- Générateur
- Cuve à électrophorèse
- Peignes, Erlen, solution tampon
- Poudre d'agarose
- Solution de 100 paires de bases

Matériel et milieu pour l'antibiorésistance:

- Milieux : bouillon de soja tryptique (TSB)
- Microplaques d'antibiorésistance à 96 puits ((Tianjin of Technology and Science Development Co, Ltd., China).
- Bouillon de Mueller-Hinton (MH)
- *E. coli* ATCC25922
- Turbidimètre
- Multipette

Matériel et milieux utilisés pour l'étude histologique:

- Formol à 10%
- Alcool (différentes concentration)
- Hématoxyline-éosine
- Cassette histologique
- Paraffine liquide
- Microtome
- Résine
- Lames et couvre-lame

APPENDICE C

FICHE D'ENQUETE

Date :	Origine
Exploitation (localité).....	Age
Vétérinaire traitant.....	Effectif de l'élevage.....
Race des poulets	Type d'élevage ☐ moderne ☐ traditionnel

Colibacilloses du poulet de chair (fiche de prélèvement)

Nombre de poulets malades.....

Nombre de poulets morts.....

Symptômes observés.....

.....

.....

.....

.....

.....

Lésions

.....

.....

.....

.....

Traitement recommandé.....

.....

.....

.....

.....

Prélèvements réalisés :

.....

.....

.....

.....

.....

Animal : ☐ vivant ☐ mort

Quelles sont les autres maladies qui ont été déjà suspectées dans le même élevage ?

.....

.....

.....

.....

Quel est le taux de morbidité et de mortalité de ces maladies ?

.....

.....

.....

.....

Quels est la durée du vide sanitaire dans cet élevage ?

.....

.....

.....

.....

APPENDICE D

Article publié dans *Tropical Animal Health and Production*

Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria

Lounis Mohamed^{1,2}, Zhao Ge³, Li Yuehua³, Gao Yubin³, Kaidi Rachid², Oumouna Mustapha⁴, Wang Junwei³, Oumouna Karine⁴.

¹ Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ziane Achour, BP 3117, Route de Moudjbara, Djelfa 17000, Algérie.

² Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction Animale, Institut des Sciences Vétérinaires, Université Saad Dahleb, route de Soumaa, BP 270, Blida 09000, Algérie.

³ Laboratory of quality and safety risk assessment for animal products, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China.

⁴ Faculté des sciences, Université Yahia Fares, Médéa 26000, Algérie.

Corresponding authors

Wang Junwei:

Laboratory of quality and safety risk assessment for animal products, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China.

Oumouna Karine:

Faculté des sciences, Université Yahia Fares, Médéa 26000, Algérie.

Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria

Lounis Mohamed^{1,2} · Zhao Ge³ · Li Yuehua³ · Gao Yubin³ · Kaidi Rachid² · Oumouna Mustapha⁴ · Wang Junwei³ · Oumouna Karine⁴

Received: 22 June 2017 / Accepted: 6 November 2017 / Published online: 21 November 2017
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2017

Abstract Avian pathogenic *E. coli* (APEC) is the etiologic agent of avian colibacillosis, the most common disease responsible for chicken morbidity in the world. Although multiple virulence-associated factors were identified, their prevalence in Algeria is still poorly known. In the present research, 92 avian pathogenic *E. coli* (APEC) isolates were recovered from broilers with clinical signs and lesions of colibacillosis. In addition, 32 *E. coli* isolates collected from feces of healthy birds (AFEC) were included for comparison. All isolates were investigated by PCR for the presence of a total of 11 virulence-associated genes described for avian pathogenic (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA*, and *fimC*) and diarrheagenic *E. coli* (*eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH*, and *aggR*). The sensitivity of 39 APEC isolates to 16 antibiotics was also determined using antimicrobial pretreated microplates. Here, we report that 98% of the examined isolates host at least one of the tested virulence factors. The most prevalent genes in APEC were *iutA* (90.6%), *ompT* (86.9%), and *iss* (85.8%); whereas, *iutA* (78.1%), *fimC* (78.1%), and *iroN* (68.7%) were the highest prevalent genes in AFEC. Our data showed that none of the AFEC isolates harbor any of the tested diarrheagenic genes. Moreover,

only *elt/est* (5.4%), *stx* (2.1%), and *ipaH* (2.1%) genes were carried by APEC isolates. We further established that ceftazodime, ceftiofur, mequindox, amoxicillin/clavulanic acid, and meropenem were the most efficient antibiotics against the analyzed APEC isolates. Overall, our findings provide more insights about APEC and AFEC virulence potential in Algeria which could participate in the fight against colibacillosis.

Keywords *E. coli* · APEC · AFEC · Avian colibacillosis · Virulence factors · Antibiotics · Algeria

Introduction

Avian colibacillosis is one of the most common diseases leading to significant economic losses to the poultry industry in the world (Schouler et al. 2012; Paixao et al. 2016). It is a localized or systemic infection, characterized by various syndromes including respiratory disease, septicemia, swollen head syndrome, yolk sac infection, omphalitis, and cellulitis, or a combination of these syndromes (Ahmed et al. 2013; De Carli et al. 2015).

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is the causative agent of colibacillosis. It is a Gram-negative bacterium that belongs to the *Enterobacteriaceae* family and considered to be a member of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) group (de Oliveira et al. 2015; Wang et al. 2015).

Recently, various virulence genes were described in APEC-encoding adhesins, toxins, iron uptake systems, autotransporter, and resistance to the host serum (Ewers et al. 2004; Schouler et al. 2012). Avian fecal *E. coli* (AFEC) isolated from healthy birds may also carry some virulence factors reflecting their virulence potential (Hiki et al. 2014).

However, it has been shown that five genes, the salmochelin siderophore receptor (*iroN*), the episomal outer membrane

✉ Wang Junwei
yffs2000@sina.com

✉ Oumouna Karine
benacourkarine1@gmail.com

¹ Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ziane Achour, BP 3117, Route de Moudjbara, 17000 Djelfa, Algeria

² Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction Animale, Institut des Sciences Vétérinaires, Université Saad Dahleb, Route de Soumaa, BP 270, 09000 Blida, Algeria

³ Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Animal Products, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China

⁴ Faculté des Sciences, Université Yahia Fares, 26000 Médéa, Algeria

protease T (*ompT*), the putative avian hemolysin (*hlyF*), the episomal increased serum survival (*iss*), and the ferric aerobactin receptor (*iutA*), located on the large virulence plasmid ColV are associated with highly pathogenic APEC strains and are more frequently isolated from APEC than AFEC (Johnson et al. 2008; Ahmed et al. 2013; Kafshdouzan et al. 2013; de Oliveira et al. 2015; Sola-Gines et al. 2015).

In addition, *fimC* (type 1 fimbriae C) is another virulence factor highly associated with APEC (Ewers et al. 2004; Jeong et al. 2012). It is an essential element of fimbrial assembly and anchoring and contributes to *E. coli* adherence to host epithelial cells of the respiratory tract for colonization (Jeong et al. 2012).

On the other hand, recent studies have demonstrated the presence of a number of diarrheagenic virulence genes like *eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH*, and *aggR* in APEC strains (Hughes et al. 2009; Kagambega et al. 2012; Zakeri 2014; Ramadan et al. 2016). This suggests its considerable zoonotic potential and its possible risks to humans.

In Algeria, like other countries, avian colibacillosis is responsible for large economic losses. However, very little data are available on virulence features of avian *E. coli*. To provide more details about the frequency of some virulence factors described for APEC (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA*, and *fimC*) and diarrheagenic *E. coli* (*eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH*, *aggR*) in Algeria, two panels of PCRs were investigated in *E. coli* isolates collected from diseased and presumably healthy broilers. The susceptibility to 16 antibiotics was also investigated for some of APEC isolates.

Materials and methods

Sampling identification and isolation of bacteria

In this study, 92 isolates were isolated from the liver, heart, and spleen of freshly died broiler chickens suffering from colibacillosis and 32 isolates were collected from feces or cloacal swabs of apparently healthy broiler chickens from 6 diagnosis veterinary clinics located in various regions of Algeria (Tizi

Ouzou, Bouira, Boumerdes, and M'sila). The liver, spleen, lung, and feces were first cultured on nutrient broth (Institut Pasteur, Algeria: IPA) aerobically at 37 °C for 18 to 24 h before being subcultured on Mac Conkey agar (Celmed company, Algeria) at the conditions described above. For each sample, a single suspected colony was picked and subcultured on nutrient agar (IPA) overnight at 37 °C. Then, isolates with typical characteristics were identified biochemically using Gram staining, oxydase test, and API20E® system (Biomerieux, France). *E. coli* isolates were stored in storage agar at 4 °C until use.

DNA extraction

Genomic DNA extraction was accomplished as described by Blanco et al. (2004). Bacterial isolates were, first, subcultured overnight at 37 °C in Trypticase Soy Broth (TSB) before being suspended in 200 µL of sterile water. Bacteria were boiled for 10 min to release the DNA, followed by centrifugation at 10,000 rpm/5 min. The supernatant containing DNA was stored at –20 °C until use for PCR experiments.

Polymerase chain reaction

E. coli isolates were analyzed by PCR for the presence of the virulence-associated genes. The detection of *hlyF*, *iroN*, *iss*, *ompT*, *fimC*, and *iutA* was analyzed by simplex PCR using 200 ng of DNA, 12.5 µL of GO Taq® Green Mix (Promega), 10.5 µL nuclease-free water (Sigma-Aldrich), and 0.5 µL of each primer (10 µM) as described by Jeong et al. (2012) (Table 1). The cycling conditions consisted of a 5-min activation step at 95 °C, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, annealing temperature (listed in Table 1) for 30 s, 72 °C for 1 min, and followed by the final extension step at 72 °C for 10 min.

Genes *eae*, *stx*, *est*, *elt*, *ipaH*, and *aggR* were detected by multiplex PCR performed with 200 ng of DNA, 12.5 µL of GO Taq® Green Mix (Promega), 10.5 µL nuclease-free water (Sigma-Aldrich), and 1 µL of mixed primer (10 µM) selected

Table 1 Primers of genes encoding virulence factors specific to APEC isolates

Gene	Primer sequences (3'–5')		Annealing (°C)	References
<i>hlyF</i>	For	GGCGATTTAGGCATTCCGATACTC	59	Jeong et al. (2012)
	Rev	ACGGGGATCGCTAGTTAAGGAG		
<i>iroN</i>	For	AAAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	61	Jeong et al. (2012)
	Rev	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
<i>Iss</i>	For	AGCAACCCGAACCACTTGATG	57	Jeong et al. (2012)
	Rev	TAATAAGCATTGCCAGAGCGG		
<i>ompT</i>	For	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	57	Jeong et al. (2012)
	Rev	CCCGGGTCATAGTGTTCATC		
<i>fimC</i>	For	GGAAATAACATTCTGCTTGC	51	Jeong et al. (2012)
	Rev	TTTGTTCATCAAGAATACG		
<i>iutA</i>	For	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	61	Johnson et al. (2008)
	Rev	CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG		

Table 2 Primers of genes encoding virulence factors specific to diarrheagenic *E. coli* isolates (Toma et al. 2003)

Gene	Primer sequences (3'–5')	
<i>eae</i>	For	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC
	Rev	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG
<i>stx</i>	For	GAGCGAAATAATTTATATGTG
	Rev	TGATGATGGCAATTCAGTAT
<i>est</i>	For	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG
	Rev	CCTGATCCTCAAAAGAGAAAATTAC
<i>elt</i>	For	TCTCTATGTGCATACGGAGC
	Rev	CCATACTGATTGCCGCAAT
<i>ipaH</i>	For	GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC
	Rev	GCCGCTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC
<i>aggR</i>	For	GTATACACAAAAGAAGGAAGC
	Rev	ACAGAATCGTCAGCATCAGC

according to Toma et al. (2003) (described in Table 2). The PCR program consisted of a 5-min activation step at 95 °C, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

Amplicons were separated by 1% ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis along with a 100-bp ladder (BIOWEST, Hong Kong, China) and visualized under UV light.

Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined for 39 APEC isolates for 16 antibiotics using commercialized antimicrobial pretreated microplates (Tianjin of Technology and Science Development Co, Ltd., China). For each sample, one *E. coli* colony obtained on TSB was collected and used to prepare standardized inoculum (5.10^7 UFC/mL). After dilution in Mueller-Hinton Broth (MHB), each isolate inoculum was deposited on the antimicrobial pretreated microplates according to the manufacturer's instructions. *E. coli* ATCC25922 was used as control.

The MICs were defined for ampicillin (0.25–512 µg/mL), amoxicillin-clavulanic acid (0.25/0.12–512/256 µg/mL), tetracycline (0.25–512 µg/mL), doxycycline (0.25–512 µg/mL), gentamicin (0.25–512 µg/mL), sulfamethoxazole-trimethoprim (0.06/1.18–32/608 µg/mL), ceftiofur (0.12–256 µg/mL), ceftazodime (0.12–256 µg/mL), enrofloxacin (0.015–32 µg/mL), ofloxacin (0.03–64 µg/mL), meropenem (0.03–64 µg/mL), florfenicol (0.12–256 µg/mL), and sulfisoxazole (0.25–512 µg/mL) based on Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI 2008, 2014). For colistin (0.12–256 µg/mL) and spectinomycin (0.25–512 µg/mL), epidemiological cutoff (ECOFF) values recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing were used (EUCAST 2017). However,

for mequindox (0.5–256 µg/mL), results with MIC ≥ 64 µg/mL values were considered resistant (He et al. 2015).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Chi-square. Data were considered as significant when the *p* value was ≤ 0.05.

Results

Prevalence of virulence-associated genes

In this study, we examined 124 *E. coli* (92 APEC and 32 AFEC) for the presence of 11 virulence-associated genes. The prevalence of each gene in APEC and AFEC isolates is shown in Table 3. PCR analysis revealed that over than 98% of the isolates had at least one virulence-associated factor. More precisely, out of 92 APEC isolates, 79 (85.9%) were positive for *iss*, 76 (82.6%) for *hlyF*, 74 (80.4%) for *ompT*, 80 (86.9%) for *iroN*, 65 (70.6%) for *fimC*, and 83 (90.2%) for *iutA*. While, out of 32 AFEC isolates, 15 (46.8%) were positive for *iss*, 19 (59.3%) for *hlyF*, 19 (59.3%) for *ompT*, 22 (68.7%) for *iroN*, 25 (78.1%) for *fimC*, and 25 (78.1%) for *iutA*.

Genes *iroN*, *iss*, *hlyF*, and *ompT* were significantly more prevalent in APEC than AFEC isolates. However, a clear difference in *iutA* and *fimC* prevalence between APEC and AFEC isolates was not found. Interestingly, the *fimC* gene seemed to be more prevalent in AFEC (APEC 70.6%, AFEC 78.1%).

Regarding the diarrheagenic-associated factors, our data revealed that out of all 92 APEC isolates, 9 (9.7%) carried at least one of them, 5 (5.4%) were positive for either *est* or *elt*

Table 3 Prevalence of virulence-associated genes in APEC and AFEC isolates

Genes	APEC		AFEC	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>iss</i>	79	85.9***	15	46.9
<i>hlyF</i>	76	82.6***	19	59.4
<i>ompT</i>	74	80.4*	19	59.4
<i>iroN</i>	80	87*	22	68.8
<i>fimC</i>	65	70.7	25	78.1
<i>iutA</i>	83	90.2	25	78.1
<i>elt/est</i>	5	5.4	0	0
<i>stx</i>	2	2.2	0	0
<i>ipaH</i>	2	2.2	0	0
<i>eae</i>	0	0	0	0
<i>aggR</i>	0	0	0	0

Results were compared using the Chi-square test

p* < 0.05; **p* < 0.01

genes, 2 (2.1%) for *stx*, and 2 (2.1%) for *ipaH*. Nonetheless, no positive isolates were detected for *eae* and *aggR* genes. However, none of the AFEC isolates harbored any of the diarrheagenic-examined genes.

Co-existence of virulence-associated genes of APEC

Different combinations of virulence genes detected were further investigated. As shown in Table 4, the most prevalent combinations observed in APEC were *iroN-iutA* (81.5%), *iroN-iss* (80.4%), and *iss-iutA* (78.3%). In contrast, combinations detected with the highest prevalence in AFEC were *iutA-fimC* (71.9%), *iutA-iroN* (62.5%), and *iroN-fimC* (62.5%).

Most interestingly, out of all 92 APEC isolates, 57.6% harbored the common combination *iroN-iss-hlyF-ompT-iutA*. Thus, only 25% of AFEC isolates were positive. Moreover, 47.8% of APEC isolates did not only carry the five genes, but were also positive for *fimC* gene.

Of note, the two combinations *iroN-iss-hlyF-ompT-iutA* and *iroN-iss-hlyF-ompT-iutA-fimC* were statistically associated with APEC.

Antibiotic resistance

Thirty-nine isolates of APEC were tested for their susceptibility to 16 antibiotics (Table 5). Results showed that the highest rates of resistance were against tetracycline and doxycycline (97.4%). High levels of resistance were also observed for

sulfisoxazole (94.9%), thrimetoprim-sulfamethoxazole (92.3%), enrofloxacin (92.3%), ampicillin (89.7%), ofloxacin (84.6%), florfenicol (82%), and spectinomycin (61.5%).

Medium resistance was shown to gentamicin (38.5%) and colistin (35.9%).

Ceftazodime (2.6%), ceftiofur (5.1%), mequindox (5.1%), amoxicillin/clavulanic acid (7.7%), and meropenem (7.7%) seemed to be the most efficient antibiotics against APEC isolates.

Multiple resistances were further analyzed in APEC isolates. Interestingly, all isolates showed a resistance against at least three antibiotic families (Fig. 1). Strongly, 15.4, 23.1, 35.9, and 20.5% of the isolates were resistant to a panel of 4, 5, 6, or 7 antibiotic families.

Discussion

In this report, 92 APEC and 32 AFEC isolates were screened for 11 virulence genes. Ninety-eight percent of the isolates had at least one virulence factor. Genes *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA*, and *fimC* constitute the most common profile characterizing the APEC pathotype. In the present research, *iutA* was the most prevalent gene in APEC with the frequency of 90.2%. This finding is in accordance with previous publications describing a high prevalence (about 80%) (Johnson et al. 2008; Schouler et al. 2012). However, this result disagrees with a

Table 4 Percentage of associations between the detected virulence-associated genes in APEC and AFEC isolates

		<i>iss</i>	<i>hlyF</i>	<i>ompT</i>	<i>iroN</i>	<i>iutA</i>	<i>fimC</i>	<i>est/elt</i>	<i>stx</i>	<i>ipaH</i>
APEC	<i>iss</i>	—								
	<i>hlyF</i>	73.9***	—							
	<i>ompT</i>	72.8***	69.6*	—						
	<i>iroN</i>	80.4***	76.1*	72.8*	—					
	<i>iutA</i>	78.3***	76.1*	75.0*	81.5*	—				
	<i>fimC</i>	75.0*	72.8	70.7*	76.1	76.1	—			
	<i>elt/est</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	4.3	5.4	—		
	<i>stx</i>	1.1	1.1	1.1	1.1	2.2	1.1	0	—	
	<i>ipaH</i>	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	0	0	—
AFEC	<i>iss</i>	—								
	<i>hlyF</i>	40.6	—							
	<i>ompT</i>	28.1	40.6	—						
	<i>iroN</i>	46.9	53.1	43.8	—					
	<i>iutA</i>	43.8	56.3	56.3	62.5	—				
	<i>fimC</i>	43.8	56.3	50.0	62.5	71.9	—			
	<i>elt/est</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—		
	<i>stx</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
	<i>ipaH</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—

Results were compared using the Chi-square test

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Table 5 Rates of resistance of APEC isolates to antibiotics

Antibiotics	Rate of resistance (%)
Ampicillin	89.7
Amoxicillin/clavulanic acid	7.7
Tetracycline	97.4
Doxycycline	97.4
Gentamicin	38.5
Spectinomycin	61.5
Sulfisoxazole	94.9
Trimethoprim/sulfamethoxazole	92.3
Ceftiofur	5.1
Ceftazodime	2.6
Florfenicol	82.1
Enrofloxacin	92.3
Ofloxacin	84.6
Colistin	35.9
Meropenem	7.7
Mequindox	5.1

previous study showing lower levels of 49 and 64% (Unno et al. 2011; Li et al. 2015). Like *iutA*, *ompT* had a high prevalence in APEC (80.4%) which is consistent with other reports illustrating an equally high prevalence of this gene (Johnson et al. 2008; Kafshdouzan et al. 2013; De Carli et al. 2015; Sola-Gines et al. 2015). In contrast, lower detection rates were described (Mbanga and Nyararai 2015; Li et al. 2015). Regarding *hlyF* gene, the prevalence scored in APEC (82.6%) is fully compatible with other published finding (Johnson et al. 2008; Kafshdouzan et al. 2013; Hussein et al. 2013). Mbanga and Nyararai (2015) found a lower *hlyF* gene prevalence of 24.4%. Curiously, *iss* was one of the most prevalent genes (85.8%) among the APEC, whereas it had the lowest prevalence rate in AFEC (46%). Similar observations were also reported (Ahmed et al. 2013; Hussein et al. 2013). These findings may prove valuable for the idea of *iss* use in APEC identification. At the same time, either in APEC or in

AFEC isolates, we reported a high rate of *iroN* and *fimC* genes. These data confirm several published reports showing that most APEC stains express both *iroN* and *fimC* genes (Johnson et al. 2008; Wang et al. 2015; Paixao et al. 2016). Interestingly, the combination *iroN-fimC* was carried by 62.5% of the AFEC isolates. This may support the hypothesis that this combination plays no critical role in avian colibacillosis diagnostic.

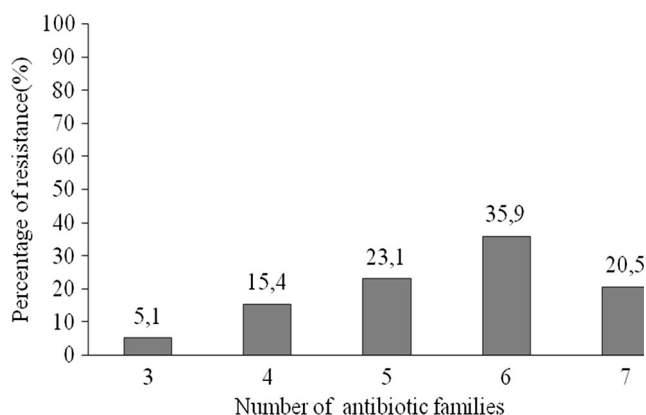
In this study, 25% of AFEC isolates analyzed carried the combination *iroN-iss-hlyF-ompT-iutA* commonly known to be highly associated with APEC pathotype. Moreover, 18.8% of AFEC did not only harbor the five genes, but were also positive for *fimC* gene indicating a possible reservoir of virulence-associated genes in this population. However, the presence of these two combinations was much higher in APEC than AFEC isolates. This finding is in accordance with that of previous reports (Johnson et al. 2008; Ahmed et al. 2013; Kafshdouzan et al. 2013; Hiki et al. 2014; Sola-Gines et al. 2015).

On the other hand, AFEC isolates analyzed in this study showed almost a high prevalence of *fimC* as well as *iroN*, both claimed to be implicated in the early stages of the colibacillosis infection. Hence, this could pave the way to the AFEC virulence potential increase when the possibility arises.

The prevalence of diarrheagenic genes namely *eae*, *stx*, *elt/est*, *ipaH*, and *aggR* was further evaluated. None of the AFEC isolates harbored any of these genes. In addition, neither *eae* nor *aggR* were detected in any of the investigated APEC isolates. This result is not compatible with that of other reports describing a rate of 50% positive isolates (Roussan et al. 2014). However, our data revealed that genes *est/elt* or *ipaH* were present with the low prevalence of 5.4 and 2.1%, respectively. None of these genes were detected in the study of Unno et al. (2011). Moreover, our data reported that 2.1% of the analyzed APEC isolates host *stx*. These results are in accordance to those reported for *stx1* in diarrheagenic chickens in Algeria (Mellata et al. 2001). However, this prevalence seemed to be lower than those described by Ramadan et al. (2016), reporting *stx1* and *stx2* in 9.1 and 35% of the studied *E. coli* isolates, respectively.

APEC isolates were not only tested for the presence for virulence genes, but also for their susceptibility to antibiotics. Our data showed a high level of resistance against tetracycline (97.4%), doxycycline (97.4%), sulfisoxazole (94.9%), thrimetoprim-sulfamethoxazole (92.3%), enrofloxacin (92.3%), ampicillin (89.7%), ofloxacin (84.6%), florfenicol (82%), and spectinomycin (61.5%). These results are in accordance with those of recent studies in western and eastern Algeria (Benameur et al. 2014; Messai et al. 2015). These findings seem to be not surprising due to the accrue use of these antibiotics in veterinary medicine in Algeria.

Gentamicin (38.5%) and colistin (35.9%) seemed to have an intermediary activity against APEC in the current study. However, these antibiotics showed a high efficiency rate in

**Fig. 1** Prevalence of multidrug resistance in APEC isolates

several previous reports (Aggad et al. 2010; Benameur et al. 2014; Messaï et al. 2015). Thus, it appears that the resistance to these two antimicrobials might be in increment nowadays. The moderate resistance of gentamicin may be due to its illicit use knowing that this antibiotic is prohibited in veterinary medicine in Algeria.

In fact, high efficient level was observed for ceftazodime (2.6%), ceftiofur (5.1%), mequindox (5.1%), amoxicillin/clavulanic acid (7.7%), and meropenem (7.7%). Nonetheless, Benameur et al. (2014) and Messaï et al. (2015) reported a high level of resistance against either amoxicillin/clavulanic acid or ceftiofur (Benameur et al. 2014; Messaï et al. 2015). While ceftazodime, meropenem, and mequindox seemed to be almost efficient against APEC isolates. This is probably due to their non-use in Algerian veterinary field.

In conclusion, this is the first report of the prevalence of the common virulence factors in APEC and AFEC in Algeria. The results of this study are in accordance with those reported in several countries describing a high prevalence of these virulence factors in APEC than AFEC. However, the presence of these genes in AFEC isolates poses a potential risk of causing colibacillosis. Thus, further studies must be carried out to establish their importance in the pathogenesis of this disease.

Acknowledgments We want to thank all members of the laboratories Quality and Safety Risk Assessment for Animal Products, CAHEC, Qingdao, China, and *Laboratoire d'hygiène intercommunale*, Draa El Mizan, Algeria, for their precious help. We also thank Dr. Catherine Schouler (INRA, Tours, France) for her valuable support.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aggad, H., Ahmed Ammar Y., Hammoudi, A. and Kihal, M., 2010. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis, *Global Veterinaria*, 4, 303–306
- Ahmed, A.M., Shimamoto, T. and Shimamoto, T., 2013. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers, *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 475–483
- Benameur, Q., Guemour, D., Hammoudi, A., Aoudiad, H., Aggad, H., Humblet, M.F. and Saegeman, C., 2014. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens in West of Algeria, *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 13, 366–370
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi G., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I. and Blanco, J., 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*), *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 645–651
- CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standard-Third Edition (Informational Supplement, M31-A3) Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne
- CLSI, 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement (M100-S24) Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne
- De Carli, S., Ikuta, N., Lehmann, F.K.M. da Silveira, V.P., Predebon, G.M., Fonseca, A.S.K. and Lung, V.R., 2015. Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil, *Poultry Science*, 00, 1–6
- de Oliveira, A.L., Rocha, D.A., Finkler, F., de Moraes, L.B., Barbieri, N.L., Pavanello, D.B., Winkler, C., Grassotti, T.T., de Brito, K.C.T., de Brito B.G. and Horn, F., 2015. Prevalence of ColV Plasmid-Linked Genes and In Vivo Pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*, *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 679–684
- EUCAST, 2017. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 4.0. 2014, Available online: <http://www.eucast.org> (accessed on 20 May 2017)
- Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp H.C. and Wieler L.H., 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry, *Veterinary Microbiology*, 104, 91–101
- He, T., Wang, Y., Qian, M. and Wu C., 2015. Mequindox resistance and in vitro efficacy in animal-derived *Escherichia coli* strains, *Veterinary Microbiology*, 177, 341–346
- Hiki, M., Usui, M., Akiyama, T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima, A. and Asai, T., 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan, *Irish Veterinary Journal* 67, 14
- Hughes, L.A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T.R., Jones, R.C., Lahuerta-Marin, A., McNiffe, K., Norman, D., Williams, N.J. and Chantrey, J., 2009. Risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* virulence genes *eae*, *stx1* and *stx2* in wild bird populations, *Epidemiology and Infection*, 137, 1574–1582
- Hussein, A.H.M., Ghanem, I.A.I., Eid, A.A.M., Ali, M.A., Sherwood, J.S., Li, G., Nolan, L.K., Logue, C.M., 2013. Molecular and Phenotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chicken Flocks in Egypt, *Avian Diseases*, 57, 602–611
- Jeong, Y.W., Kim, T.E., Kim, J.H. and Kwon, H.J., 2012. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea, *Journal of Veterinary Science*, 13, 145–152
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C. and Nolan, L.K., 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool, *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3987–3996
- Kafshdouzan, K., Zahraei Saleh, T., Nayeri Fasaee, B., Madadgar, O., Yamasaki, S., Hinenoya, A. and Yasuda, N., 2013. Distribution of virulence associated genes in isolated *Escherichia coli* from avian colibacillosis, *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 7, 1–6
- Kagambega, A., Martikainen, O., Siitonen, A., Traore, A.S., Barro, N. and Haukka, K., 2012. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso, *Microbiology Open*, 1, 276–284
- Li, Y., Chen, L., Wu, X. and Huo S., 2015. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers, *Poultry Science*, 94, 601–611
- Mbanga, J. and Nyararai, Y.O., 2015. Virulence gene profiles of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Bulawayo, Zimbabwe, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 82, 850
- Mellata, M., Bakour, R., Jacquemin, E. and Mainil, J.G., 2001. Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria, *Avian Disease*, 45, 670–679

- Messaï, C.R., Aït-Oudhia, K., Khelef, D., Hamdi, T.M., Chenouf, N.S. and 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, 9, 2358–2363
- Paixao, A.C., Ferreira, A.C., Fontes, M., Themudo, P., Albuquerque, T., Soares, M.C., Feveireiro, M., Martins, L. and Correa de Sa, M.I., 2016. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates, Poultry Science, 95, 1646–1652
- Ramadan, H., Awad, A. and Ateya, A., 2016. Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic *Escherichia coli* in Egypt, Journal of Infection in Developing Countries, 10, 584–591
- Roussan, D.A., Zakaria, H., Khawaldeh, G. and Shaheen, I., 2014. Differentiation of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains from Broiler Chickens by Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and Random Amplified Polymorphic (RAPD) DNA, Open Journal of Veterinary Medicine, 4: 211–219
- Schouler, C., Schaeffer, B., Bree, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J. and Moulin-Schouleur, M., 2012. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes, Journal of Clinical Microbiology, 50, 1673–1678
- Sola-Gines, M., Cameron-Veas, K., Badiola, I., Dolz, R., Majo, N., Dahbi, G., Viso, S., Mora, A., Blanco, J., Piedra-Carrasco, N., Gonzalez-Lopez, J.J. and Migura-Garcia, L., 2015. Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Causing Outbreaks of Colibacillosis in Broilers during 2012 in Spain, PLoS One, 10, e0143191
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M., Iwanaga, M., 2003. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*, Journal of Clinical Microbiology, 41, 2669–2671
- Unno, T., Han, D., Jang, J., Widmer, K., Ko, G., Sadowsky, M.J. and Hur, H.G., 2011. Genotypic and phenotypic trends in antibiotic resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from humans and farm animals in South Korea, Microbes Environ, 26, 198–204
- Wang, J., Tang, P., Tan, D., Wang, L., Zhang, S., Qiu, Y., Dong, R., Liu, W., Huang, J., Chen, T., Ren, J., Li, C. and Liu, H.J., 2015. The Pathogenicity of Chicken Pathogenic *Escherichia coli* Is Associated with the Numbers and Combination Patterns of Virulence-Associated Genes, Open Journal of Veterinary Medicine, 5, 243–254
- Zakeri A., 2014. Detection of the *eaeA* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens by Polymerase Chain Reaction, Iranian Journal of Applied Animal Science, 4, 417–420

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barnes, H.J., Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P., "Colibacillosis", in: Saif, Y.M. (Ed) Diseases of Poultry, 12th, (2008) 691-732 (Ed. Blackwell Publishing, Ames, IA).
2. Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J. and Moulin-Schouleur, M., "Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of Virulence genes". J. Clin. Microbiol., V.50, n° 5, (2012), 1673-1678.
3. Paixao, A.C., Ferreira, A.C., Fontes, M., Themudo, P., Albuquerque, T., Soares, M.C., Fevereiro, M., Martins, L. and Correa de Sa, M.I., "Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates". Poultry Science, V. 95, (2016), 1646–1652.
4. Ewers, C., Janßen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C. and Wieler, L.H., "Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry". Vet. Microbiol., V.104, (2004), 91-101.
5. Luthul- Kabir, S.M.L., "Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at the epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns". Intern. J. Environ.I Res. Pub. Health, V. 7, n°1, (2010), 89-114.
6. Ahmed, A.M., Shimamoto, T. and Shimamoto, T., "Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers". Intern. J. Med. Microbiol., V. 303, (2013), 475–383.
7. De Carli, S., Ikuta, N., Lehmann, F.K.M. da Silveira, V.P., Predebon, G.M., Fonseca, A.S.K. and Lung, V.R., "Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil". Poultry Science, V. 00, (2015), 1–6
8. Kunert Filho, H.C., Brito, K.C.T., Cavalli L.S. and Brito B.G., "Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) - an update on the control". The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (A. Méndez-Vilas, Ed.), (2015), 598- 618.
9. Wang, J., Tang, P., Tan, D., Wang, L., Zhang, S., Qiu, Y., Dong, R., Liu, W., Huang, J., Chen, T., Ren, J., Li, C. and Liu, H.J., "The Pathogenicity of chicken pathogenic *Escherichia coli* is associated with the numbers and combination patterns of virulence-associated genes", Open J. Vet. Med., V.5, (2015), 243-54

10. Dziva, F. and Stevens, M.P., "Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts". Avian Pathology, V. 37, n° 4, (2008), 355-366.
11. Mellata, M., Touchman, J.W. and Curtiss. R., "Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E-coli* chi 7122 (O78:K80:H9)". PLoS One, V.4, (2009), e4232.
12. Mellata, M., "Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends". Foodborne Pathog. Dis. V.10, (2013), 916-932.
13. Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J. and Nolan, L.K., "DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains". J. Bacteriol. V.188, (2006), 745 758.
14. Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C. and Nolan, L.K., "Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool". J. Clin. Microbiol., V. 46, n°12, (2008), 3987-3996.
15. Jeong, Y.W., Kim, T.E., Kim, J.H. and Kwon, H.J., "Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea", J.Vet. Sci., V.13, (2012), 145–152
16. Dissanayake, D.R., Octavia, S. and Lan, R., "Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka". Vet Microbiol., V. 168, (2014), 403-412.
17. Kemmett, K., Williams, N.J., Chaloner, G., Humphrey, S., Wigley, P. and Humphrey, T., "The contribution of systemic *Escherichia coli* infection to the early mortalities of commercial broiler chickens". Avian Pathology, V. 43, (2014), 37-42.
18. Delicato, E.R., de Brito, B.G., Gaziri, L.C. and Vidotto, M.C., "Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis". Vet. Microbiol., V. 94, (2003), 97-103.
19. Ewers, C., Janßen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C. and Wieler L.H., "Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction". Avian Dis., V. 49, n°2, (2005), 269-73.
20. Ngeleka, M., Brereton, L., Brown, G., Fairbrother, J.M., "Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and

- antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers". *Avian Dis.*, V. 46, (2002), 143-152.
21. Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan L.K., "Characterizing the APEC pathotype". *Vet. Res.* V.36, (2005), 241-256
 22. Hughes, L.A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T.R., Jones, R.C., Lahuerta-Marin, A., McNiffe, K., Norman, D., Williams, N.J. and Chantrey, J., "Risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* virulence genes *eae*, *stx1* and *stx2* in wild bird populations", *Epidemiol. Infection*, V. 137, (2009), 1574-82.
 23. Kagambèga, A., Martikainen, O., Siitonen, A., Traore, A., Barro, N. and Haukka, K., Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. *Microbiology Open*, V. 1, n°3, (2012), 276–284.
 24. Zakeri A., "Detection of the *eaeA* Gene in *Escherichia coli* isolated from broiler chickens by polymerase chain reaction". *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, V. 4, (2014), 417–420.
 25. Ramadan, H., Awad, A. and Ateya, A., "Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic *Escherichia coli* in Egypt". *J.Infect. Dev. Count.*, V.10, (2016), 584–591.
 26. Fricke, W.F., McDermott, P.F., Mammel, M.K., Zhao, S., Johnson, T.J., Rasko, D.A., Fedorka-Cray, P.J., Pedroso, A., Whichard, J.M., Leclerc, J.E., White, D.G., Cebula, T.A. and Ravel, J., "Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry". *Applied and Environmental Microbiology*, V. 75, (2009), 5963-5971.
 27. Johnson, T.J., Skyberg, J. and Nolan, L.K., "Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis". *Avian Dis.*, V.48, (2004), 351-360.
 28. Guabiraba, R. and Schouler, C., "Avian colibacillosis: still many black holes". *FEMS Microbiology Letters*, V. 362, n°15, (2015).
 29. Barnes, H.J., Vaillancourt, J., Gross WB. Colibacillosis. In: Saif, Y.M. (ed.) *Diseases of Poultry*.. Ames, IA: Iowa State University Press, (2003), 631–652.
 30. Robineau, B. et Moalic, P.Y., "Une maladie d'actualité en production aviaire: la colibacillose". *Bull. Acad. Vét. France*, V. 163, n°3, (2010), 207-212.

31. Zhao, L., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., Gao, Q. and Liu, X., "Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model". *Microbiology*, V. 155, (2009), 1634–1644.
32. Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., A.L.T, K., Antão, E.M., Laturnus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinrück, H., Philipp, H.C. and Wieler, L.H., "Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: how closely related are they?". *Int. J. Med. Microbiol.*, V. 297, (2007), 163-176.
33. Tivendale, K.A., Logue, C.M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y., Nolan, L.K., "Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease". *Infection and Immunity*, V. 78, (2010), 3412-3419.
34. Dhama, K., Chakraborty, S., Barathidasan, R., Tiwari, R., Rajagunalan, S. and Singh, S.D., "*Escherichia coli*, an economically important avian pathogen, its disease manifestations, diagnosis and control, and public health significance: A review". *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* V. 3, n°6, (2013), 179-194.
35. La Ragione, R.M. and Woodward, M.J., "Virulence factor of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colispticaemia". *Res. Vet. Sci.*, V.73, (2002), 27-35.
36. Stordeur, P. and Mainil, J., "La colibacillose aviaire". *Ann. Méd. Vét.*, V. 146, (2002), 11-18.
37. Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M., "Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)". *Vet. Res.*, V. 30, (1999), 299-316.
38. Nakazato, G., Campos, T.A., Stehling, E.G., Brocchi, M. and Silveira, W.D., "Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)". *Pesquisa Veterinária Brasileira*, V. 29, n°7, (2009), 479-486.
39. Gross W.B., "Colibacillosis". In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M. and Yoder, J.H.W., *Disease of Poultry*. 9th ed. Iowa State University Press, Ames, (1991), 138-144.

40. Vaillancourt, J.P. and Barnes, H.J., "Coliform Cellulitis (Inflammatory Process)". In: Saif, Y.M. (ed.) Diseases of Poultry. Ames, IA: Iowa State University Press, (2003), 652–656.
41. Pakpinyo, S., Ley, D.H., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P and Guy J.S., "Prevalence of enteropathogenic *E. coli* in naturally occurring cases of poultry enteritis mortality syndrome". Avian Dis. V. 46, (2002), 360–369.
42. Mainil, J., "*Escherichia coli* virulence factors". Veterinary Immunology and Immunopathology, V. 152, (2013), 2–12.
43. Turblin, V., 2009. "*E. coli* in poultry production: Laboratory diagnostic of avian pathogenic strains (APEC)". CEVA Animal Health Asia, n°26 (sept 2009).
44. Kunert-Filho, H.C., Carvalho, D. Grassotti, T.T., Soares, B.D., Rossato, J.M., Cunha, A.C., Brito, K.C.T., Cavalli, L.S. and. Brito, B.G., "Avian pathogenic *Escherichia coli* - methods for improved diagnosis". World's Poultry Science Journal, V. 71, (June 2015).
45. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F. and Di Ilio, C., "*Escherichia coli* in Europe: An Overview". Int. J. Environ. Res. Publ. Health, V.10, (2013), 6235-54.
46. Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H. and McNeish. A.S., "Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*". Infect. Immun., V. 57, (1989), 1290-1298.
47. Nataro, J.P. and Kaper. J.B., "Diarrheagenic *Escherichia coli*". Clin. Microbiol. Rev., V. 11, (1998), 142-201.
48. Milon, A., Oswald, E. and De Rycke. J., "Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*". Vet. Res., V. 30, (1999), 203-219.
49. Beutin, L., "*Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats". Vet. Res. V. 30, (1999), 285-298.
50. Verweyen, H.M., Karch, H., Brandis, M. and Zimmerhackl. L.B., "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes". Pediatr. Nephrol. V. 14, (2000), 73-83.
51. Rangel, J.M., Spaling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L., "Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 Outbreaks, United States, 1982–2002". Emerg. Infect. Dis., V.11, n°4, (2005), 603-609.

52. Doyle, M.P. and Schoeni, J.L., "Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 53, n°10, (1987), 2394-2396.
53. Nagy, B., and Fekete, P.Z., "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals". *Vet. Res.* V. 30, (1999), 259-284.
54. Nair G.B. and Takeda, Y., "The heat stable enterotoxins". *Microbial pathogenesis*, V.24, n°2, (1998), 123-131.
55. Okhuysen, P.C. and Dupont. H.L., "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance". *The Journal of Infectious Diseases*, V. 202, n°4, (2010), 503–5.
56. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer M M., Renschmidt, C., Wilking H, Deleré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, et al, "German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts". *N. Eng. J. Med.*, V. 365, (2011), 1763-1770.
57. Olesen, B., Scheutz, F., Andersen, R.L., Menard, M., Boisen, N., Johnston, B., Hansen, D.S., Krogfelt, K.A., Nataro, J.P. and Johnson, J.R., "Enterotoxigenic *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection". *J. Clin. Microbiol.*, V. 50, n°11, (2012), 3703–11.
58. Navarro-Garcia, F. and Elias, W.P., "Autotransporters and virulence of enterotoxigenic *E. coli*". *Gut Microbes*, V. 2, n°1, (2011), 13-34.
59. Johnson, J.R., Owens, K., Gajewski, A. and Clabots, C., "*Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection". *J. Infect. Dis.*, V. 197, (2008), 218-24.
60. Kaper, J.B, Nataro, J.P and Mobley, H.L., "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nature Reviews. Microbiology*, V. 2, n°2, (2004), 123–40.
61. Overall, J.C., "Neonatal bacterial meningitis. Analysis of predisposing factors and outcome compared with matched control subjects". *J. Pediatr.*, V. 76, (1970), 499-511.
62. Ron, E.Z., "Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens". *Curr. Opin. Microbiol.*, V. 9, (2006), 28-32.
63. Johnson, T.J., Giddings, C.W., Horne, S.M. Gibbs, P.S., Wooley, R.E., Skyberg, J., Olah, P., Kercher, R., Sherwood, J.S., Foley, S.L. and Nolan, L.K., "Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a

- conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate". Avian Dis., V. 46, (2002), 342-352.
64. Belanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E. and Dozois, C.M., "*Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, V.62 (2011), 1–10.
 65. Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K., Nolan, L.K., "Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis". *Microbiology*, V. 151, (2005), 2097–2110.
 66. Ewers, C., Antao, E.M., Diehl, I., Philipp, H.C. and Wieler, L.H., "Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential". *Applied and Environmental Microbiology*, V. 75, n°1 (2009), 184-192.
 67. Johnson, T.J., and Nolan, L.K., "Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, V. 73, (2009), 750-774.
 68. Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C. Curtiss, R., "Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region". *Infect. Immun.*, V. 68, (2000), 4145-4154.
 69. DebRoy, C., Roberts, E., Fratamico, P.M., "Detection of O antigens in *Escherichia coli*". *Animal Health Research Reviews*, V. 12, n°2, (2011), 169-185
 70. Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M. and Fen P., "Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*". *Frontiers in Microbiology*, V. 7, (2016), 644.
 71. Huja, S., Oren, Y., Trost, E., Brzuszkiewicz, E., Biran, D., Blom, J., Goesmann, A., Gottschalk, G., Hacker, J., Rone, E.Z., Dobrindt, U., "Genomic avenue to avian colisepticémie". *M. Bio.*, V. 13, n°6, (2015), 1.
 72. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Jansen, W.H., Garcia, V., Vazquez, M.L. and Blanco, J., "Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (northwest Spain)". *Vet. Microbiol.*, V. 61, (1998), 229-235.
 73. Gross, W.B., "Diseases due to *Escherichia coli* in poultry". In: Gyles, C.L. (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and man. CAB International, Wallingford, United Kingdom, (1994), 237–259.

74. Peighambari, S.M., Julian, R.J., Vaillancourt, J.P. and Gyles, C.L., "*Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens". Avian Dis., V. 39, (1995), 125-134.
75. Ngeleka, M., Kwaga, J.K., White, D.G., Whittam, T.S., Riddell, C., Goodhope, R., Potter, A.A. and Allan, B., "*Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds". Infect Immun., V. 64, (1996), 3118-3126.
76. Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C., Hachich, E.M., Sato, M.I.Z., Gomes, T.A.T., Amaral, L.A. and Ottoboni, L.M.M., "*Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination". BMC Microbiol., V. 10, (2010), 161.
77. Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guignon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X. and Drisse, S., "Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains". BMC Genomics, V. 9, (2008), 560.
78. Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E., "Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group". Applied and Environmental Microbiology, V. 66, n°10, (2000), 4555-4558.
79. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E. and Gordon, D.M., "The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups". Environmental microbiology reports, V. 5, n°1, (2013), 58-65.
80. Wang, X.M., Liao, X.P., Zhang, W.J., Jiang, H.X., Sun, J., Zhang, M.J., He X.F., Lao, D.X. and Liu, Y.H., "Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in South of China". Foodborne Pathogen Dis., V.7, n°9, (2010).
81. Cunha, M.P.V., Oliveira, M.G.X., Oliveira, M.C.V., Silva, K.C., Gomes, C.R., Moreno, A.M. and Knöbl, T., "Virulence profiles, phylogenetic background, and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from turkeys with airsacculitis". The Scientific World J., Article ID 289024, (2014), 1-8.
82. Kemmett, K., Humphrey, T., Rushton, S., Close, A., Wigley, P. and Williams NJ., "A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of fecal and

- systemic *E. coli* in commercial broiler chickens". PLoS One, V. 8, (2013), e67749. Doi: 10.1371/journal.pone.0067749.
83. Campos, T.A., Lago, J.C., Nakazato, G., Stehling, E.G., Brocchi, M., Castro, A.F.P. and Silveira, W.D., "Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC)". Pesquisa Veterinária Brasileira, V. 28, nº10, (2008), 533-540.
 84. Logue, C.M., Wannemuehler, Y., Nicholson, B.A., Doetkott, C., Barbieri, N.L. and Nolan, L.K., "Comparative Analysis of Phylogenetic Assignment of Human and Avian ExPEC and Fecal Commensal *Escherichia coli* Using the (Previous and Revised) Clermont Phylogenetic Typing Methods and its Impact on Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Classification". Front. Microbiol. V. 8, (2017), 283.
 85. Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S, Germon, P, Rasschaert, D. and Schouler, C., "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns". J. Clin. Microbiol., V.45, nº10, (2007), 3366-76.
 86. Jakobsen, L., Kurbasic, A., Skjot-Rasmussen, L., Porsho, L.J., Pedersen, K., Jensen, L.B., Emborg, H.D., Aarestrup, F.M., Frimodt-Moller, N. and Hammerum, A.M., "*Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection". Foodborne pathogens and disease, V.7, nº5, (2010), 537-547.
 87. Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E., "The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection". Infection and immunity, V.67, nº2 (1999), 546-553.
 88. Esenstein, B.I. and Jone, G.W., "The spectrum of infection and pathogenic mechanisms of *Escherichia coli*". Adv. Intern. Med., V.33, (1988), 231-252.
 89. Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C.M., Curtiss, R., Lehoux, B. and Fairbrother, J.M., "Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages". Infect. Immun., V. 71, (2003), 494-503.

90. Johnson, J.R. and O'Bryan, T.T., "Detection of the *Escherichia coli* Group 2 polysaccharide capsule synthesis gene kpsM by a rapide and specific PCR-based assay". J. Clin. Microbiol., V.42, n°4, (2004), 1773-1776.
91. Pourbakhsh, S.A., Boulianne, M., Martineau-Doize, B. and Fairbrother, J.M., "Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens". Vet. Microbiol., V. 58, (1997), 195-213.
92. Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C.M., Curtiss, R., Brown, P.K., Arne, P., Bree, A., Desautels, C. and Fairbrother, J.M., "Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity". Infect. Immun., V. 71, (2003), 536-540.
93. McPeake, S.J., Smyth, J.A. and Ball, H.J., "Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. Vet. Microbiol., V.110, (2005), 245-253.
94. Pfaff-McDonough, S.J., Horne, S.M., Giddings, C.W., Ebert, J.O., Doetkott, C., Smith, M.H. and Nolan, L.K., "Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis". Avian Dis., V. 44, n°1, (2000), 23-33.
95. Mbanga, J. and Nyararai, Y.O., "Virulence gene profiles of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Bulawayo, Zimbabwe". Onderstepoort J. Vet. Res., V. 82, n°1, (2015), 850.
96. Knöbl, T., Saidenberg, A.B.S., Moreno, A.M., Gomes, T.A.T., Vieira, M.A.M., Leite D.S., Blanco J.E. and Ferreira A.J.P., "Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds". Pesquisa Veterinária Brasileira, V. 31, n°10, (2011), 916-921.
97. Mellata, M., Ameiss, K., Mo, H. and Curtiss, R., "Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli* chi 7122 (O78:K80:H9)". Infect. Immun., V. 78, (2010), 1528-1541.
98. de Campos, T.A., Stehling E.G., Ferreira, A., Pestana de Castro, A.F., Brocchi, M., and da Silveira, W.D., "Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains". Vet. Microbiol., V. 106, (2005), 275-285.
99. Lillington, J., Geibel, S. and Waksman, G., "Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili". Biochimica Biophysica Acta, V. 1840, (2014), 2783–2793.

100. Orndorff, P.E., "*Escherichia coli* type1 pili. Molecular genetics of bacterial pathogenesis". In Miller, V.L. kaper, J.B., Portnoy, D.A. and Isberg, R.R., (eds). Washington, DC, ASM, (1994), 91-111.
101. Wooley, R.E., Gibbs P.S., Brown, T.P., Glisson, J.R., Steffens, W.L. and Maurer, J.J., "Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11". Avian Dis., V. 42, (1998), 194-198.
102. Janßen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H.C. and Wieler, L.H., "Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis". Int. J. Med. Microbiol., V. 291, (2001), 371-378.
103. Kawano, M., Yaguchi, K. and Osawa, R., "Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan". Microbiol. Immunol., V. 50, (2006), 961-966.
104. Won, G.Y., Moon, B.M., Oh, I.G., Matsuda, K., Chaudhari, A.A., Hur, J., Eo, S.K., Yu, I.J., Lee, Y.J., Lee, Y.S., Kim, B.S. and Lee, J.H., "Profiles of virulence-associated genes of avian pathogenic *E coli* isolates from chickens with colibacillosis". J. Poultry Sci., V. 46, (2009), 260-266.
105. Jin, W.J., Zheng, Z.M., Zhang, Y.Z., Qin, A.J., Shao, H.X., Liu, Y.L., Wang, J. and Wang, Q.D., "Distribution of Virulence- Associated Genes of Avian Pathogenic *E coli* Isolates in China". Agri. Sci. China, V. 7, (2008), 1511-1515.
106. Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M.R., Brée, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., Blanco, J. "Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin". J. Clin. Microbiol., V. 44, n°10, (2006), 3484-3492.
107. Vandekerchove, D., Vandemaele, F., Adriaensen, C., Zaleska, M., Hernalsteens, J.P., De Baets, L., Butaye, P., Van Immerseel, F., Wattiau, P., Laevens, H., Mast, J., Goddeeris, B. and Pasmans, F., "Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks". Vet. Microbiol., V.108, (2005),75-87.
108. Mainil, J., "Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasivesd'*Escherichia coli* :l) les adhésines et facteurs de colonisation". Ann. Méd. Vét., V. 147, (2003), 105-126.

109. Orskov, I., and Orskov, F., "Serologic classification of fimbriae". Curr. Top. Microbiol. Immunol., V. 151, (1990), 71-90.
110. Mol, O., and Oudega, B. "Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*". FEMS Microbiol. Rev., V. 19, (1996), 25-52.
111. Lindberg, F., Lund, B., Johansson, L. and Normark, S., "Localization of the receptor-binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus". Nature, V. 328, (1987), 84-87.
112. Lund, B., Lindberg, F., Marklund, B.I. and Normark, S., "The PapG protein is the alpha-D-galactopyranosyl-(1-4)-beta-D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 84, (1987), 5898-5902.
113. Ghanbarpour, R., Sami, M., Salehi, M. and Ouromiei, M., "Phylogenetic background and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from colisepticemic and healthy broiler chickens in Iran". Trop. Anim. Health Prod., V. 43, (2011), 153-157.
114. Knöbl, T., Tania, A.T.G., Midolli, M.A.V., Bottino, J.A. and Ferreira, A.J.P., Detection of pap, sfa, afa and fim adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*". Intern. J. Appl. Res. Vet. Med., V. 2, (2004), 135-141.
115. Kariyawasam, S., Johnson, T.J. and Nolan, L.K., "The pap operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island". Infect. Immun., V. 74, (2006), 744-749.
116. Olsen, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S. and Normark, S., "The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of csgA, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*". Mol. Microbiol., V. 7, (1993), 523-536.
117. Persson, K., Russell, W., Morgelin, M. and Herwald, H., "The conversion of fibrinogen to fibrin at the surface of curliated *Escherichia coli* bacteria leads to the generation of proinflammatory fibrinopeptides". J. Biol. Chem., V. 278, (2003), 31884-31890.
118. Maurer, J.J., Brown, T.P., Steffens, W.L. and Thayer, S.G., "The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive

- hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*". Avian Dis., V. 42, (1998), 106-118.
119. La Ragione, R.M., Collighan, R.J. and Woodward, M.J., "Non-curliation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in csgB and reduced persistence in poultry infection". FEMS Microbiol. Lett., V.175, (1999), 247-253.
 120. Jianguo, Y., Weihua, C., Huaifu, W. and Wei, Z., "Antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from faeces samples of chickens in east China". Afr. J. Microbiol. Res., V.6, n°7, (2012), 1591-1596.
 121. de Oliveira, A.L., Rocha, D.A., Finkler, F., de Moraes, L.B., Barbieri, N.L., Pavanelo, D.B., Winkler, C., Grassotti, T.T., de Brito, K.C.T., de Brito B.G. and Horn, F., "Prevalence of ColV plasmid-linked genes and *in vivo* pathogenicity of avian strains of *Escherichia coli*". Foodborne Pathogens Dis., V. 12, (2015), 679–684.
 122. Sadeghi Bonjar, M.S., Salari, S., Jahantigh, M. and Rashki, A., "Frequency of *iss* and *irp2* genes by PCR method in *Escherichia coli* isolated from poultry with colibacillosis in comparison with healthy chicken in poultry farms of Zabol, South East of Iran". Polish J. Vet. Sci., V. 20, n°. 2, (2017), 363–367.
 123. Hussein, A.H.M., Ghanem, I.A.I., Eid, A.A.M., Ali, M.A., Sherwood, J.S., Li, G., Nolan, L.K. and Logue, C.M., "Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt". Avian Dis., V. 57, (2013), 602–611.
 124. De Brito, B.G., Gaziri, L.C. and Vidotto, M.C., "Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis". Infect. Immun., V. 71, (2003), 4175-4177.
 125. Binns, M.M., Davies, D.L. and Hardy, K.G., "Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance". Nature, V. 279, (1979), 778-781.
 126. Chuba, P.J., Palchaudhuri, S. and Leon, M.A., "Contributions of *traT* and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94". FEMS Microbiol. Lett., V. 37, (1986), 135–140.
 127. Barondess, J.J., and Beckwith. J., "A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda". Nature, V. 346, (1990), 871-874.

128. Kienle, Z., Emödy, L., Svanborg, C., O'toole, P.W., "Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*". *Microbiology*, V. 138, (1992), 1679–1687.
129. Xie, Y., Parthasarathy, G., Di Cello, F., Teng, C.-H., Paul-Satyaseela, M., Kim, K.S., "Transcriptome of *Escherichia coli* K1 bound to human brain microvascular endothelial cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, V. 365, (2008), 201–206.
130. Hejair Hassan, M.A., Ma, J., Zhu, Y., Sun, M., Dong, W., Zhang, Y., Pan Z., Zhang W. and Yao, H., "Role of outer membrane protein T in pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*". *Res. Vet. Sci.*, V. 115, (2017), 109–116.
131. Provence, D.L. and Curtiss, R., "Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain". *Infect. Immun.*, V. 62, (1994), 1369-1380.
132. Stathopoulos, C., Provence, D.L and Curtiss, R., "Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters". *Infect. Immun.*, V. 67, (1999), 772-781.
133. Kostakioti, M. and Stathopoulos C., "Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain". *Infect. Immun.*, V. 72, (2004), 5548-5554.
134. Rocha, A.C.G.P., Rocha, S.L.S., Lima-Rosa, C.A.V., Souza, G.F., Moraes, H.L.S., Salle, F.O., Moraes L.B. and. Salle C.T.P., "Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory case of poultry". *Pesq. Vet. Bras.*, V. 28, (2008), 183-186.
135. Circella, E., Pennelli, D., Tagliabue, S., Ceruti, R., Giovanardi, D., Camarda, A., "Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* of turkey". *Ital. J. Anim. Sci.*, V. 8, (2009), 775-779.
136. Eftekharian, S., Ghorbanpoor, M, Seyfi Abad Shapouri, M.R, Ghanbarpour, R., Jafari, R. and Amani, A., "Frequency of selected virulence-associated genes in intestinal and extra-intestinal *Escherichia coli* isolates from chicken". *Iran. J. Vet. Med.*, V. 10, n°2, (2016), 91-96.
137. Mohsenifard, E., Asasi, K., Sharifiyazdi, H. and Basaki, M., "Phylotyping and ColV plasmid-associated virulence genotyping of *E. coli* isolated from

- broiler chickens with colibacillosis in Iran". *Comp. Clin. Pathol.*, V.25, n°5, (2016), 1035-1042.
138. Mainil, J., "Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : II) Franchissement des muqueuses et propriétés invasives". *Ann. Méd. Vét.*, V. 147, (2003), 159-171.
 139. Caza, M., Lepine, F., Milot, S. and Dozois, C.M., "Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins". *Infect. Immun.*, V. 76, (2008), 3539-3549.
 140. Okeke, I.N., Scaletsky, I.C., Soars, E.H., Macfarlane, L.R., and Torres, A.G., "Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*". *J. Clin. Microbiol.*, V. 42, (2004), 36-44.
 141. Ons, E., Bleyen, N., Tuntufye, H.N., Vandemaele, F. and Goddeeris, B.M., "High prevalence iron receptor genes of avian pathogenic *Escherichia coli*". *Avian Pathology*, V. 36, n°5, (October 2007), 411-414.
 142. Sabri, M., Leveille, S. and Dozois, C.M., "A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide". *Microbiology*, V. 152, (2006), 745-758.
 143. Sabri, M., Caza, M., Proulx J., Lymberopoulos, M.H., Bree, A., Moulin-Schouleur, M., Curtiss, R. and Dozois, C.M., "Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122". *Infect. Immun.*, V. 76, (2008), 601-611.
 144. Parreira, V.R. and Gyles, C.L., "Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*". *Veterinary Microbiology*, V. 87, (2003), 341-352.
 145. Roussan, D.A., Zakaria, H., Khawaldeh, G. and Shaheen, I., Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* strains from broiler chickens by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and random amplified polymorphic (RAPD) DNA, *Open J. Vet. Med.*, V.4, (2014), 211–219.
 146. Garcia, T.A.V., Christy, L., Smith, M.A., Merrell, D., Scott, O., Alison, D., "Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder". *Infect. Immun.*, V. 81, n°1, (Janvier 2012), 99-109.

147. Wiles, T.J., Dhakal, B.K., Eto, D.S. and Mulvey, M.A., "Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins". *Mol. Biol. Cell.*, V. 19, (2008), 1427-38.
148. Wiles, T.J., Kulesus, R.R. and Mulvey, M.A., "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*". *Exp. Mol. Pathol.*, V.85, (2008), 11-9.
149. Skyberg, J.A., Johnson, T.J. and Nolan, L.K., "Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid". *BMC Microbiol.*, V. 8, n° 24, (2008), 1-8.
150. Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Pénary, M., Nougayrède, J.P., Dozois, C., Hayashi, T. and Oswald, E., "HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis". *J. Infect. Dis.*, V.213, n°5, (2016), 856-65.
151. Dheilly, A., Boudier, A., Le Devendec, L., Hellard, G. and Kempf, I., "Clinical and microbial efficacy of antimicrobial treatments of experimental avian colibacillosis". *Vet. Microbiol.*, V.149, (2011), 422–429.
152. Agunos, A., Léger, D. and Carson, C., "Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada". *Can. Vet. J.* V. 53, (2012), 1289–1300.
153. Mendonça, N., Figueiredo, R., Mendes, C., Card, R.M., Anjum, M.F. and da Silva, G.J., "Microarray Evaluation of Antimicrobial Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Isolates from Portuguese Poultry". *Antibiotics*, V. 5, n°4, (2016).
154. Awad, A., Arafat, N. and Elhadidy, M., "Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*". *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* V. 15, n°59, (2016).
155. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A. and Blanco, J. "Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chicken in Spain". *J. Clin. Microbiol.*, V. 35, n°8, (1997), 2184-2185.
156. White, R.L., Friedrich, L.V., Mihm, L.B., and Bosso, J.A., "Assessment of the relationship between antimicrobial usage and susceptibility: differences between the hospital and specific patient-care areas". *Clin. Infect. Dis.*, V. 31, (2000), 16-23.

157. Rubin, J.E., and Pitout, J.D.D, "Extended-spectrum b-lactamase, carbapenemase and AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals". Veterinary Microbiology, V.170, (2014), 10–18
158. Paterson, D.L., "Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*". Am. J. Med. V.119, n°6A, (2006), 20–28.
159. Olsen, R.H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B. and Christensen, H., "Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings". Avian Pathology, V. 43, n°3, (2014), 199–208.
160. Wright, G.D., "Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? ". BMC biology, V. 8, (2010), 1–6.
161. Smith, J.L., Drum, D.J., Dai, Y., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., Hofacre, C.L. and Lee. M.D. "Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens". Appl. Environ. Microbiol., V. 73, (2007), 1404-1414.
162. Kim, T.E., Jeong, Y.W., Cho, S.H., Kim, S.J. and Kwon, H.J., "Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates". J. Clin. Microbiol., V.45, (2007), 3309-15.
163. Li, Y., Chen, L., Wu, X. and Huo S., "Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers". Poultry Science, V.94, (2015), 601–611.
164. Messai, C.R., Ait-Oudhia, K., Khelef, D., Hamdi, T.M., Chenouf, N.S. and Messai, M.R., "Serogroups and antibiotic susceptibility pattern of avian pathogenic *Escherichia coli* strains responsible for colibacillosis in broiler breeding farms in the east of Algeria". Afr. J. Microbiol. Res., V. 9, n°49, (2015), 2358-2363.
165. Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssary, C., Touati, A. and Rolain J.M., "Molecular characterization of extended-spectrum b-lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Bejaia, Algeria". Journal of Global Antimicrobial Resistance, V. 6, (2016), 108–112.
166. Sawant, A.A., Hegde, N.V., Straley, B.A., Donaldson, S.C., Love, B.C., Knabel, S.J. and Jayarao, B.M., "Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria from Dairy Cattle". Appl. Environ. Microbiol., V. 73, n°1, (Jan. 2007), 156–163.

167. Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J. and McDermott, P.F., "Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002". *Emerg. Infect. Dis.*, V.18, n°5, (May 2012), 741-749.
168. Gyles, C.L., "Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry". *Animal Health Research Reviews, Conference of Research Workers in Animal Diseases*, V.9, (2008), 149–158.
169. Li X.S, Wang G.Q, Du X.D, Cui B.A, Zhang S.M, Shen J.Z., Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from diseased chickens. *J. Vet. Sci.*, V. 8, n°3, (2007), 243–247.
170. Dou, X., Gong, J., Han, X., Xu, M., Shen, H., Zhang, D., Zhuang, L., Liu, J. and Zou J., "Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China". *Gene*, V.15, n°576, (2016), 244-248.
171. Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H., Boutaiba, B.M., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B. and Rahal, K., "Analysis of high levels of multidrug resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria". *African Journal of Microbiology Research*, V. 10, n°42, (2016), 1792-1797.
172. Al-Bahry¹, S., Al-Sharji, N., Yaish, M., Al-Musharafi, Sa. and Mahmoud, I., "Diversity of Tetracycline Resistant Genes in *Escherichia coli* from Human and Environmental Sources". *The Open Biotech. J.*, V.10, n°2, M2, (2016), 289-300.
173. Huovinen, P., Sundstrom, L., Swedberg, G. and Skold, O., "Trimethoprim and sulfonamide resistance". *Antimicrob. Agents Chemother.*, V.39 n°2, (Feb 1995), 279-289.
174. Yu, H.S., Lee, J.C, Kang, H.Y., Jeong, Y.S., Lee, E.Y., Choi, C.H, Tae, S.H., Lee, Y.C., Seol, S.Y. and Cho, D.T., "Prevalence of *dfr* genes associated with integrons and dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea". *J. Antimicrob. Chemother.*, V. 53, (2004), 445-450.
175. Yu, J.L., Wu, S.X. and Jia, H.Q., "Study on antimicrobial susceptibility of bacteria causing neonatal infections: a 12 year study (1987-1998)". *Singapore Med. J.*, V. 42, (2001), 107-110.

176. Solberg, O.D., Ajiboye, R.M. and Riley, L.W., "Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*". J. Clin. Microbiol., V. 44, (2006), 1347-1351.
177. Gómez, P.A.J, de los Rios J.E.G., Mendoza, A.R., Ramonet P.P., Albiach, R.G. and Sainz M.P.R., "Molecular basis of quinolone resistance in *Escherichia coli* from wild birds". Can. J. Vet. Res., V.68, n°3 (2004), 229-231.
178. Kohanski M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J., "How antibiotics kill bacteria, from targets to networks". Nature rev. Microbiol., V.8, n°6, (2010), 423-435.
179. Talan, D.A., Krishnadasan, A., Abrahamian, F.M., Stamm, W.E. and Moran, G.J., "Prevalence and risk factor analysis of trimethoprim-sulfamethoxazole- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* infection among emergency department patients with pyelonephritis". Clin. Infect. Dis., V. 47, (2008), 1150-1158.
180. Lautenbach, E., Strom, B.L., Nachamkin, I., Bilker, W.B., Marr, A.M, Larosa, L.A. and Fishman, N.O., "Longitudinal trends in fluoroquinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolates from inpatients and outpatients, 1989-2000: differences in the emergence and epidemiology of resistance across organisms". Clin. Infect. Dis., V. 38, (2004), 655-662.
181. Hafed, Z., Benguedour, R., Aboussaleh, Y., Zeghari, L., Aouane, M, Berrid, N., Abouchouaib, N. and Sbaibi, R., "Profil d'antibiorésistance d'*Escherichia coli* d'origine aviaire: cas de poulet de chair dans la région de grande Casablanca-Maroc". Am. J. innov. Res. Appl. Sci., V. 2, n°2, (2015), 50-54.
182. Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P., "Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem". Clin. Microbiol. Inf., V.14, n°4, (2008), 295-297.
183. Yang, T., Zeng, Z., Rao, L., Chen, X., He, D., Lv, L., Wang, J., Zeng, L., Feng, M. and Liu J.H., "The association between occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates of different origins". Veterinary Microbiology, V.170, (2014), 89–96.
184. Hooper, D.C. and Jacoby, G.A., "Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance". Ann. New York Acad. Sci. V.1354, (2015), 12-31.
185. Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., Lavigne, J.P, Pantel, A., "Clonal relationship between human and avian

- ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria". Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. V., 35, (2016), 227–234.
186. Laarem, M., Barguigua, A., Nayme, K., Abdi, A., Zerouali, K., El Mdaghri, N., Timinouni, M., "Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria". J. Infect. Dev. Ctries, V.11, n°2, (2017), 143-151.
 187. Kempf, I., Fleury, M.A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec J.Y. and Jouy, E., "What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe?". International Journal of Antimicrobial Agents, V. 42, n°5, (2013), 379-383.
 188. Kempf, I., Jouy, E., Chauvin, C., "Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals". Intern. J. Antimicrob. Agents, V.46, n°6 (2016), 598-606.
 189. Huang, X., Yu, L., Chen, X., Zhi, C., Yao, X., Liu, Y., Wu, S., Guo, Z., Yi, L., Zeng, Z. and Liu, J.H., "High Prevalence of Colistin Resistance and *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Food Animals in China". Front. Microbiol., V.8, (2017), 562.
 190. Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., et al., "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study". Lancet Infect Dis., V.16, n°2, (2016), 161-168.
 191. Yang, Y.Q., Li, Y.X., Song, T., Yang, Y.X., Jiang, W., Zhang, A.Y., Guo, X.Y., Liu, B.H., Wang, Y.X., Lei, C.W., Xiang, R. and Wang, H.N., "Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China". Antimicrob. Agents Chemother., V. 61, n°5, (2017), e01204-16.
 192. Barbieri, L.N, Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S., Nolan, L.K. and Logue, C.M., "*mcr-1* identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC)". PLoS One, V.12, n°3, (2017), e0172997.
 193. Azam, M., Ehsana, I., Rahmana, S., Saleemi, M.K., Javed, M.R., Mohsin, M., "Detection of colistin resistance gene *mcr-1* in avian-pathogenic *Escherichia coli* in Pakistan". J. Glob. Ant. Resist., V.11, (2017), 152-153.
 194. Sayers, A.A. and Amabile-Cuevas C.F., "Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination". Antimicrob. Agent Chemother. V.41, n°11, (1997), 2321-2325.

195. Johnson, T.J. and Nolan, L.K., "Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*". Microbiol. Mol. Biol. Rev., V. 73, (2009), 750-774.
196. Johnson, T.J., Johnson, S.J. and Nolan, L.K., "Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids". J. Bacteriol., V. 188, (2006), 5975-5983.
197. Johnson, J.R., Roberts, P.L. and Stamm, W.E. "P fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patients' characteristics". J. Infect. Dis., V. 156, (1987), 225-229.
198. Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Owens, K., Gajewski, A. and Winokur, P.L., "Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans". J. Infect. Dis., V. 188, (2003), 759-768.
199. Manges, A.R., Johnson, J.R., Foxman, B., O'Bryan, T.T., Fullerton, K.E. and Riley, L.W., "Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group". New Engl. J. Med., V. 345, (2001), 1007-1013.
200. Moreno, E., Prats, G., Sabate, M., Perez, T., Johnson, J.R. and Andreu, A., "Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*". J. Antimicrob. Chemother., V. 57, (2006), 204-11.
201. Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M., Iwanaga, M., "Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*", J. Clin. Microbiol., V. 41, (2003), 2669–2671.
202. C.L.S.I., "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals". Approved Standard-Third Edition (Informational Supplement, M31-A3) Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, (2008).
203. C.L.S.I., "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing". Twenty-Fourth Informational Supplement (M100-S24) Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, (2014).

204. He, T., Wang, Y., Qian, M. and Wu C., "Mequindox resistance and in vitro efficacy in animal-derived *Escherichia coli* strains". Vet. Microbiol., V. 177, (2015), 341–346.
205. Gabe, M., "Techniques histologiques". Masson Ed., (1968), p1113.
206. Al-Arfaj, A.A., Ali, M.S., Hessain, A.M., Zakri, A.M., Dawoud, T.M., Al-Maary, K.S., Ihab Moussa, M., "Phenotypic and genotypic analysis of pathogenic *Escherichia coli* virulence genes recovered from Riyadh, Saudi Arabia". Saudi Journal of Biological Sciences, V. 23, (2016), 713–717.
207. Abd El- Tawab, A.A., Ammar, A.M., El-Hofy, F.I., Abdel Hakeem, M. and Abdel Galil, N.M., "Molecular screening of virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli*". Benha Vet. Med. J., V. 30, n°1, (March, 2016), 137-149.
208. Unno, T., Han, D., Jang, J., Widmer, K., Ko, G., Sadowsky, M.J. and Hur, H.G., "Genotypic and phenotypic trends in antibiotic resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from humans and farm animals in South Korea". Microbes Environ. V. 26, (2011), 198–204.
209. Moon, B.M., Won, G.Y., Choi, Y.Y., Jin J.K., Oh I.G., Park J.H., Eo S.K. and Lee, J.H., "Isolation and characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli* from birds associated with colibacillosis". Proceedings of AZWMP. Chulalongkorn Uni. Fac. of Vet. Sc., Bangkok, Thailand, (26-29 Oct 2006).
210. Literak, I., Reitschmied, T., Bujnakova, D., Dolejska, M., Cizek, A., Bardon, J., Pokludova, L., Alexa, P., Halova, D. and Jamborova, I., "Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic". Microb. Drug Resist., V. 19, (2013), 57-63.
211. Radwan, I.A.H, Salam, H.S.H., Abd-Alwanis, S.A.E.A., Al-Sayed, M.Y., "Frequency of some virulence associated genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from septicemic broiler chicken". International Journal of Advanced Research, V. 2, n°12, (2014), 867-874.
212. Kafshdouzan, K., Zahraei Saleh, T., Nayeri Fasaei, B., Madadgar, O., Yamasaki, S., Hinenoya, A. and Yasuda, N., "Distribution of virulence associated genes in isolated *Escherichia coli* from avian colibacillosis". Iranian Journal of Veterinary Medicine, V. 7, (2013), 1-6.
213. Hiki, M., Usui, M. Akiyama, T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima, A. and Asai, T., "Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of

223. Zahraei Salehi, T., Safarchi, A., Peighambari, S. M., Mahzounieh, M. and Rabbani Khorasgani, M., "Detection of *stx1*, *stx2*, *eae*, *espB* and *hly* genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction". J. Vet. Res., V. 62, n°2, (2007), 37-42.
224. Ghanbarpour, R., Salehi, M. and Oswald, E., "Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny". Comp. Clin. Pathol., V.19, (2010), 147–153.
225. Mellata, M., Bakour, R., Jacquemin, E. and Mainil, J.G., "Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria". Avian Dis., V. 45, (2001), 670–679.
226. Dutta, T.K., Roychoudhury, P., Bandyopadhyay, S., Wani S.A., and Hussain I., "Detection & characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) & enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in poultry birds with diarrhea". Indian J. Med. Res., V.133, (May 2011), 541-545.
227. Kobayashi, H., Pohjanvirta, T and Pelkonen, S., "Prevalence and characteristics of Intimin and Shigatoxin producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland". J. Vet. Med. Sci., V.64, n°11, (2002), 1071-73.
228. Kagambega, A., Martikainen, O., Siitonen, A., Traore, A.S., Barro, N. and Haukka, K., "Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso". Microbiology Open, V. 1, (2012), 276–284.
229. Hammoudi, A., Aggad, H., "Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria". Turk. J. Vet. Anim. Sci., V.32, n°2, (2008), 123-126
230. Aggad, H.Y., Ammar, A., Hammoudi, A. and Kihal, M., "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. Glob. Vet., V.4, n°3, (2010) 303-306.
231. Halfaoui, Z., Menoueri, N.M. and Bendali, L.M., "Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria". Veterinary World, V.10, n°7, (2017), 830-835.
232. Messaï, C.R., Khelef, D., Boukhors, K.T., Radji, N., Goucem, R. and Hamdi, T.M., "Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens affected by colibacillosis in Setif". Afr. J. Microbiol. Res., V. 7, (2013), 2668-2672.

- Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan”, Irish Veterinary Journal, V. 67, n°14, (2014).
214. Stella, A.E., De Oliveira, M.C., Fontana, V.L.D.S., Maluta, R.P., Borges, C.A. and de Ávila, F.A., “Characterization and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from feces of healthy broiler chickens”. Arq. Inst. Biol., V.83, (2016), 1-5, e0392014.
 215. Sola-Gines, M., Cameron-Veas, K., Badiola, I., Dolz, R., Majo, N., Dahbi, G., Viso, S., Mora, A., Blanco, J., Piedra-Carrasco, N., Gonzalez-Lopez, J.J. and Migura-Garcia, L., “Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain”. PLoS One, V. 10, (2015), e0143191.
 216. Saidenberg, A.A.B., Allegretti, L., Astolfi-Ferreira, C.C.S., Ferreira, A.J.P., Almeida, M.A. and Raso, T.F., “Some virulence genes of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of healthy Alagoas Curassows (*Pauxi mitu*) in Brazil”. Pesquisa Veterinária Brasileira, V. 33, n°4, (2013), 523-527.
 217. Rashki, A., Abdi, H.A. and Shookohi, M., “Prevalence of genes encoding outer membrane virulence factors among fecal *Escherichia coli* isolates”. Int. J. Basic Sci. Med., V. 2, n°1, (2017), 52-57.
 218. Anssour, L., Messai, Y., Bakouret R., “Virulence factor profiles and genetic background of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from hospital effluent”. International Journal of Infectious Diseases, V. 53S, (2016), 4-163.
 219. Salehi, M. and Ghanbarpour, R., “Phenotypic and genotypic properties of *Escherichia coli* isolated from colisepticemic cases of Japanese quail”. Trop. Anim. Health Prod. V. 42, (2010), 1497–1504.
 220. Jamshidi, A., Razmyar, J. and Fallah, N., “Detection of *eaeA*, *hlyA*, *stx1* and *stx2* genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers affected with colibacillosis”. Iran. J. Vet. Med., V. 10, n°2, (2016), 97-103.
 221. Kiliç, A., Ertafi, H.B., Muz, A., Ozbey, G. and Kalender, H., “Detection of the *eaeA* gene in *Escherichia coli* from chickens by polymerase chain reaction. Turk. J. Vet. Anim. Sci., V.31, n°4, (2007), 215-218.
 222. Oh, J.Y. Kang M.S., An B.K., Shin E.G., Kim M.J., Kim Y.J. and Kwon Y.K., “Prevalence and characteristics of intimin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy chickens in Korea”. Poultry Sci., V. 91, (2012), 2438-43.

233. Benameur, Q., Guemourb, D., Hammoudi, A., Aoudia, K., Aggad, H., Humbletf, M.F. and Saegermang, C., "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in West of Algeria". Int. J. Sci. Basic Appl. Res., V. 13, n°1, (2014), 366-370.
234. Hassan, H.K.H., Aml, A.M., Bakheet, and Naglaa M.A., "Serotyping and sensitivity tests of pathogenic *Escherichia coli* isolated from salpingitis in commercial laying hens". Assiut Vet. Med. J., V. 61, n°144, (2015), 186-193.
235. Ameen-Ur-Rashid, Shah, S.S.A., Khan, M.A., Rafiullah, Ali A., Anwar, M., "Isolation of *Escherichia coli* from poultry liver and its antibiogram profile". Res. J. Vet. Pract., V.5, n°1, (2017), 12-14.
236. Iman, M.E.N., Khalda, A.K., Jeddah, I.I., Alhassan, A.M., Egbal, S.A., Rahim, and Salwa, A.A., "Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from broiler and layer chickens with colisepticemia in Sudan". Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr., V. 60, (2012), 417 – 426.
237. Shecho, M., Thomas, N., Kemal, J., and Muktar Y., "Cloacael Carriage and Multidrug Resistance *Escherichia coli* O157:H7 from Poultry Farms, Eastern Ethiopia". J. Vet. Med., (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8264583>
238. Saidi, B., Mafirakureva, P. and Mbanga, J., "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in and around Harare, Zimbabwe". Avian Dise. V. 57, n°1, (2013), 152-154.
239. Shtylla, T., Circella, E., Madio, A., Di Paola, G., Çabeli, P., Kumbe, I., Kika, A. and Camarda, A., "Multiple antimicrobial resistance among avian *Escherichia coli* strains in Albania". Ital. J. Anim. Sci., V. 8, (2009), 771-774.
240. Fodor I, "Antimicrobial susceptibility of *E. coli* strains isolated from a colisepticemia outbreak in broilers". Bulletin UASVM, Vet. Med., V.68, n°2, (2011), 150-153.
241. Rahimi, M., "Antibiotic-resistance profile of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates recovered from broiler chicken farms with colibacillosis in Kermanshah province, Iran". Glob. Vet., V. 10, n°4, (2013), 447-452.
242. Madadi, M.S., Ghaniei, A., Zare, P. and Isakakroudi, N., "Antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* isolates to antibacterial agents in Urmia, Iran". Int. J. Basic. Sci. Appl. Res., V. 3, n°10, (2014), 695-697.

243. Salehi, T.Z. and Bonab, S.F., "Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz Province, Iran". Intern. J. Poultry Sci., V. 5, n°7, (2006), 677-684.
244. Saberfar, E., Pourakbari, B., Chabokdavan, K., and Taj Dolatshahi, F., "Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Iranian Broiler Chicken Flocks, 2005–2006". J. Appl. Poult. Res., V.17, (2008), 302-304.
245. Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R. and Meng, J., "Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China". Journal of Clinical Microbiology, V. 42, (2004), 3483-3489.
246. Nouri Gharajalar, S. and Zare, P., "Monitoring the prevalence of the tetracycline efflux genes among *E. coli* isolated from chicken colibacillosis". Iran J. Vet. Med., V. 11, n°3, (Summer 2017).
247. Zhao, S., Maurer, J.J., Hubert, S., De Villena, J.F., McDermott, P.F., Meng, J., Ayers, S., English, L. and White, D.G., "Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates". Veterinary Microbiology, V. 107, (2005), 215-224.
248. Ammar, Y.A., Moulay, M., Bouzid, R., Benameur, Q. and Aggad, H., "Bacterial Resistance of *Enterobacterea* isolates in Western Algeria". J. Appl. Environ. Biol. Sci., V. 7, n°1, (2017), 140-145.
249. Miles, T.D., McLaughlin, W. and Brown, P.D., "Antimicrobial resistance *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans". BMC Vet. Res., V. 2, n° 7, (2006).
250. Zeryehun, T. and Bedada, B., "Resistance pattern of fecal *Escherichia coli* in selected broiler farms of eastern Hararghe zone, Ethiopia". Intern. J. Appl. Biol. Pharm. Technol., V.4, n°1, (March 2013), 188-194
251. Ojo O.E., Oni O.O., Ogunjobi, O.O., Okuboye J.O., Ogunyinka O.G. and Oyekunle, M. A., "Antimicrobial resistance in *enterobacteriaceae* from intensively-reared apparently healthy and diseased poultry in Abeokuta, Nigeria". J. Nat. Sci. Engr. Tech., V. 11, n°1, (2012), 112-128.
252. Meguenni, N., "Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez des souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires". Thèse de Doctorat en Microbiologie. Univ. Mouloud Maameri. Tizi Ouzou, (2016). 176p.

253. El-youbi, M., Belbachir, C., Lahmass, I., Sabouni, A. and Saalaoui, E., "Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* strains isolated from broiler's intestine in Oujda (Morocco)". American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, V.3, n°10, (2016), 27-32.
254. Adelowo, O.O., Fagade, O.E. and Agersø, Y., "Antibiotic resistance and resistance genes in *Escherichia coli* from poultry farms, southwest Nigeria". J. Infect. Dev. Ctries, V. 8, n°9, (2014), 1103-1112.
255. Ghaniei, A. and Peighambari, S.M., "Antimicrobial susceptibility of one thousand bacterial isolates to five antibacterial agents commonly used in the Iranian poultry industry". Iran. J.V.M., V. 6, n°1, (2012), 1-5.
256. Saleem, M., Muhammad, G., Siddik, M. and Zia, T., "*In vitro* antibiotic susceptibility profile of avian *Escherichia coli* in and around Faisalabad". Pak. Vet. J., V. 19, n°3, (1999), 139-141.
257. Jiang, H.X., Lu, D.H., Chen, Z.L., Wang, X.M., Chen, J.R., Liu, Y.H., Liao, X.P., Liu, J.H., and Zeng, Z.L., "High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China". Vet. J., V. 187, (2011), 99-103.
258. Chen, X., Zhang, W., Yin, J., Zhang, N., Geng, S., Zhou, X., Wang, Y., Gao, S and Jiao, X., "*Escherichia coli* isolates from sick chickens in China: changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013". Vet. J., V. 202, n°1, (2014), 112-115.
259. Gai, W., Wang, G., Cui, Z., Qu, Z, Cui, J., Du, X., Huang, X. and Zhao, J., "Molecular classification and drug resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from poultry in China". Int. J. Cli. Exp. Med., V.8, n°1, (2015), 836-844.
260. Nepomuceno, L.L., Maciel, K.A., Santos, H.D., Floresta, A.C., Baum, C., Dias, F.E.F., Nepomuceno, L.C. L., dos Reis, V.R., Nascimento, C.A., Alexandrino, B., Minharro, S., "Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from poultry". Acta Veterinaria Brasilica, V.10, n°1, (2016), 1-8.
261. Khodadadi, A., Nikpiran, H., Bijanzad, P., Moomivand, H. and Kahnamoie, S., "Comparing the difference of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* between broiler breeder and broiler farms with Colibacillosis in East Azerbaijan province". Euro. J. Zool. Res., V. 2, n°4, (2013), 50-54.

262. Joshi, S., Singh, R. and Singh, S.P., "Antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* isolates from Colibacillosis in and around Pantnagar, India". Vet. World, V.5, n°7, (2012), 405-408.
263. Sharada, R., Wilfred Ruban, S. and Thiyageeswaran, M., "Isolation, characterization and antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from poultry". Am. Euras. J. Sci. Res., V.5, n°1, (2010), 18-22.
264. Lee, Y.J., Cho, J.K., Kim, K.S., Tak, R.B., Kim, A.R., Kim, J.W., Im, S.K. and Kim, B.H., "Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken". J. Microbiol., V.43, n°5, (October 2005), 391-397.
265. Atere, V.A., Bamikole, A.M., Ajurojo, O.A. and Alo, O.S. "Antimicrobial resistance pattern of pathogenic *Escherichia coli* isolated from chicken liver and trachea". J. Adv. Med. Life Sci., V.3, n°3, (2015), 1-4.
266. Shehu, Z., Adamu, Y.A., Garbaa, S., Ahmada, U.S. and Bodingac, A.H., "Antibiotic resistance of isolates of *Escherichia coli* from chicken in Sokoto Metropolis, Nigeria". Scientific Journal of Microbiology, V. 4, n°6, (2015), 34-39.
267. Boudjerda, D., Brugère, H., Bibbal, D. and Lehouel, M., "Antibioresistance, phylogeny and virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat commercialised in Jijel area (East Algeria)". Bulg. J. Agric. Sci., V. 22, (2016), 505–512.
- Abu-Basha, E.A., Gharaibeh, S.M. and Thabet, A.M., "In vitro susceptibility of resistant *Escherichia coli* field isolates to antimicrobial combinations". J. Appl. Poult. Res., V. 21, (2012), 595–602.
268. Chotiah, S. and Damayanti, R., "Colibacillosis and antibiotics resistance patterns in broiler". Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology, (2016), 434-440.
269. Dutta, P., Borah, M.K., Sarmah, R. and Gangil, R., "Isolation, histopathology and antibiogram of *Escherichia coli* from pigeons (*Columba livia*)". Veterinary World, V. 6, n°2, (2013), 91-94.
270. Srinivasan, P., Balasubramaniam, G.A., Murthy, T.R. and Balachandran, P., "Pathomorphological studies of polyserositis in commercial caged layer chicken". Asian Pacific J. Tropical Medicine, V. 7, n°1, (2014), 313-320.

271. Khaton, R., Haider, M.G., Paul, P.K., Das, P.M., and Hossain, M.M., "Colibacillosis in commercial chickens in Bangladesh". Bangladesh Vet., V. 25, (2008), 17-24.
272. El-Sayed, N.M., Oda, S.S., Tohamy, H.G., El-Manakhly E. M., "Pathologic study on the enterohepatic affections in chickens at Alexandria Province, Egypt". Adv. Anim. Vet. Sci., V. 5, n°1, (2017), 30-38.
273. Kumar, D.A., Gupta, B.R.P., "Kumari M, Pathological studies on natural cases of avian colibacillosis in Haryana State". Haryana Vet., V. 52, (December, 2013), 118-120.
274. Abalaka , S.E., Sani, N.A., Idoko, I.S., Tenuche, O.Z., Oyelowo, F.O., Ejeh, S.A. and Enem, S.I., "Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock". Sokoto Journal of Veterinary Sciences, V. 15, n°3, (2017), 100-107.
275. Bajwa N.Z., Siddique M. and Javed M.T., "Pathogenesis of *Escherichia coli* in previously *Mycoplasma gallisepticum* infected layer chicks". Journal of Islamic Academy of Sciences, V. 5, n°2, (1992), 123-126.
276. Kapakin, K.A.T., Kapakin, S., Kurt, A., Iskender, H., Altun, S. and Celebi, D., "Histopathologic findings and apoptosis caused by *E. coli* in layer birds". Pak. Vet. J., V. 35, n° 4, (2015), 525-527.
277. Horn F, Correa, A.M., Barbieri, N.L., Glodde, S., Weyrauch, K.D., Kaspers, B., Driemeier, D., Ewers, C. and Wieler, L.H., Infections with avian pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains display similar lung histopathology and macrophage apoptosis". PLoS One, V. 7, (2012), e41031.