

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Institut des sciences vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

en sciences vétérinaires

Spécialité : microbiologie médicale des maladies zoonotiques

ETUDE DE LA VIRULENCE ET DE L'ANTIBIORESISTANCE DES
ESCHERCHIA COLI ISOLEES DE CAS DE COLIBACILLOSSES
AVIAIRES CHEZ LES REPRODUCTRICES CHAIR ET PONTE

Par

Zehor HALFAOUI

Devant le jury composé de :

ADEL. D	MCA, ISV, Blida 1	Président
TALI-MAAMAR. H	Professeur, IPA, Alger	Examinateuse
KHELEF. D	Professeur, ENSV	Examinateur
MOUSSA. A	MCA, ISV, Tiaret	Examinateur
KHALED.H	MCA, ISV, Blida 1	Examinateur
MENOUERI. M. N	Professeur, ISV Blida 1	Directeur

Blida, 14 Mai 2025

RESUME

La résistance aux antimicrobiens chez les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) représente une préoccupation majeure dans l'industrie aviaire mondiale et peu d'études ont recherché la résistance aux antibiotiques et les gènes de virulence parmi les APEC en Algérie.

Un total de cent souches d'*E. coli* ont été isolés à partir de volailles suspectées de colibacillose. Des tests de sensibilité aux antimicrobiens ont été effectués vis-vis de 14 antibiotiques par la méthode de diffusion sur disque. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la colistine a été recherchée par la méthode d'élution de disque en bouillon (CBDE) et par méthode de microdilution en bouillon (BMD). Des tests phénotypiques de virulence et une recherche de formation de biofilm ont été également effectués chez les souches résistantes à la colistine (résistance au sérum, production d'hémolyse et fixation du rouge Congo). En utilisant la PCR multiplex, les gènes *mcr* (*mcr-1* à 5) ; et 7 gènes liés à la virulence ont été recherchés chez ces souches.

Les résultats ont montré une résistance élevée à la tétracycline (99%), à l'acide nalidixique (92%), à la doxycycline (90%), à l'ampicilline (89 %), à l'ofloxacine (74%), au sulfaméthoxazole-triméthoprime (72%) et à l'amoxicilline-acide clavulanique (57%) ; en outre, 92 % des souches étaient multirésistantes. Le taux de résistance à la colistine était de 27 % (27/100), dont 96,3 % (26/27) des isolats étaient porteurs du gène *mcr-1*. Toutes ces souches étaient fixatrices du rouge Congo, dix souches étaient alpha hémolytiques et toutes excepté une étaient résistantes au sérum. De plus, 24/27 souches produisent des biofilms de faible adhérence. Vingt-cinq des souches résistantes à la colistine (92,59 %) possédaient au moins trois gènes de virulence. Les gènes de virulence les plus fréquemment détectés étaient : *fimH* (96,3%) suivi de *hlyF*, *iroN* et *iss* (77,7% chacun) ; *iutA* et *ompT* ont été trouvés dans 59,25% et 55,5% des souches, respectivement. La combinaison de facteurs de virulence la plus répandue est : *hlyF-iss-iroN-iutA-ompT-fimH*.

La détection de souches d'*E. coli* virulents et multirésistants aux antimicrobiens est alarmante et un programme de surveillance visant à limiter la propagation de ces pathogènes est obligatoire.

Mots clés : *Escherichia coli*, résistance aux antimicrobiens, facteurs de virulence, résistance à la colistine, volaille.

ملخص

تعد مقاومة المضادات الحيوية للإشريكية القولونية الممرضة للطيور، مصدر قلق كبير في ميدان تربية الدواجن على المستوى العالمي، و هنالك عدد قليل من الدراسات التي بحثت في مجال مقاومة المضادات الحيوية و جينات الفوهة عند الإشريكية القولونية الممرضة للطيور في الجزائر.

لقد تم عزل مجموعة مكونة من مائة سلالة من الإشريكية القولونية من الدواجن المشتبه في إصابتها بداء القولونيات. تم إجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية ضد 14 مضادا حيويا باستخدام طريقة الإنتشار القرصي و تم الكشف عن التركيز الأدنى المثبط للكوليستين (CMI) باستخدام طريقة شطف فرسن الكوليستين (CBDE) وبواسطة طريقة التخفيف الدقيق (BMD)، كما أجريت اختبارات الفوهة المظهرية على هذه السلالات (مقاومة المصل، القرفة على تفكيك الدم و تبييت اللون الأحمر للكونغو) والبحث عن تكوين الأغشية الحيوية ، وباستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل المتضاعف (PCR) تم اختبار جينات *mcr-1* إلى *mcr-5* و 7 جينات مرتبطة بالفوهة عند العزلات المقاومة للكوليستين.

أظهرت النتائج مقاومة عالية للتيراسكلين (99%) و حمض الناليديكسيك (92%) و الدوكسيسيكلين (90%) و الأمبیسیلین (89%) و الأوفلوكساسین (74%) و السلفامیتوکسانزول – تریمیثو بریم (72%) و الأموکسیسیلین – حمض کلافولانیک (57%) بالإضافة إلى ذلك كانت 92% من العزلات متعددة المقاومة.

كان معدل مقاومة الكوليستين 27% (27/100) مع وجود 96.3% (26/27) من العزلات المقاومة تحمل جين *mcr-1*. كانت جميع هذه السلالات مثبتات الكونغو الأحمر، و أظهرت عشر سلالات تحمل الدم من النوع "ألفا"، و كانت جميعها مقاومة للمصل باستثناء واحدة. بالإضافة إلى ذلك، 24 من 27 سلالة تنتج طبقة منخفضة الالتصاق من الأغشية الحيوية.

امتلكت خمس وعشرون من السلالات المقاومة للكوليستين (92.59%) ثلاث جينات الفوهة على الأقل. الفوهة الأكثر شيوعا في العزلات هي *fimH* (96.3%) يليها *iss*, *hlyF*, *iroN* (77.7% لكل منها) بينما تم وجود 59.25% و 55.5% من العزلات التي تحمل جين *A* و *iutA* على التوالي. في حين كان المزيج الأكثر شيوعا من عوامل الفوهة هو *hlyF - iss - iroN - iutA - ompT - fimH*.

إن الكشف عن عزلات الإشريكية القولونية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية و الخبيثة في نفس الوقت أمر ينذر بالخطر، و من الضروري وضع برنامج مراقبة يهدف إلى الحد من انتشار هذه الإصابات.

الكلمات المفتاحية: الإشريكية القولونية، مقاومة المضادات الحيوية، عوامل الفوهة، مقاومة الكوليستين، الدواجن

ABSTRACT

Antimicrobial resistance in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) represents a major concern in avian industry worldwide and limited studies have investigated antibiotic resistance and virulence genes among APEC in Algeria.

One hundred *E. coli* were isolated from poultry suspected of colibacillosis. Antimicrobial susceptibility testing was done on 14 antimicrobials by the disk diffusion method. Colistin minimum inhibitory concentration (MIC) was assessed by the colistin broth disk elution technique (CBDE), and the broth microdilution method (BMD). Biofilm formation research and phenotypic virulence tests were also carried out on Colistin-resistant strains. (serum resistance, haemolysis production and Congo red fixation). Using multiplex PCR, *mcr* genes (*mcr-1* to 5) and 7 virulence-related genes were investigated on these strains.

Results showed high resistance to Tetracycline (99%), Nalidixic acid (92%), Doxycycline (90%), Ampicillin (89%), Ofloxacin (74%), Sulfamethoxazole-Trimethoprim (72%), and Amoxicillin-Clavulanic acid (57%); in addition, 92% of strains were multidrug resistant. Resistance rate to Colistin was 27% (27/100) of which 96.3% (26/27) of isolates carried the *mcr-1* gene. All of these strains were Congo red binding, ten strains showed type α haemolysis and all except one were serum resistant. In addition, 24/27 isolates produce weak adherence biofilms. Twenty-five of Colistin resistant strains (92.59%) had at least three virulence genes. The most frequently isolated virulence genes were: *fimH* (96.3%) followed by *hlyF*, *iroN* and *iss* (77.7%, each), *iutA* and *ompT* were found in 59.25% and 55.5% of isolates, respectively. The most prevalent combination of virulence factors is: *hlyF-iss-iroN-iutA-ompT-fimH*. The detection of virulent and multidrug

resistant strains of *E. coli* is alarming and a surveillance program to limit the spread of these pathogens is mandatory.

Key words: *Escherichia coli*, Antimicrobial resistance, Virulence factors, Colistin resistance, Poultry.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, mes remerciements vont à mon directeur de thèse, Professeur MENOUEURI, pour son encadrement, ses conseils avisés et son soutien. Sa rigueur scientifique a été un atout précieux pour mener à bien ce travail. Il a été pour moi un guide tout au long de ce parcours doctoral. Un très grand merci.

Je souhaite également remercier Monsieur ADEL DJALLAL d'avoir accepté de présider ce jury et de nous avoir fait l'honneur de sa présence et de son expertise.

Je remercie aussi :

Madame TALI MAAMAR, de l'Institut Pasteur d'Alger, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, et de l'enrichir par ses propositions et remarques constructives.

Monsieur KHELEF Djamel, de l'école nationale supérieure vétérinaire, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, et de l'enrichir par ses commentaires constructifs.

Monsieur MOUSSA Ahmed, de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret, pour avoir accepté de faire partie du jury, et d'examiner le travail.

Monsieur KHALED Hamza, de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, et pour ses précieuses recommandations.

Un grand merci aux équipes des laboratoires de reproduction animale et de biologie moléculaire, du centre de recherche en biotechnologie (CRBt) de Constantine, et à leur tête Docteur RAHAB Hamza, pour m'avoir ouvert les portes du centre de recherche, mais aussi pour son aide technique, ses encouragements et sa disponibilité.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Docteur ACHEK Rachid, qui a grandement participé à l'aboutissement de cette recherche, pour sa disponibilité et ses encouragements, je lui suis profondément reconnaissante.

Je ne pourrais également oublier l'aide précieuse de Docteur BENDALI Mohamed Lyes, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a offert une paillasse dont j'y avais recours à chaque étape de la réalisation de la thèse, il n'a jamais lésiné sur les moyens pour que je puisse aboutir à mon but, je lui exprime toute ma gratitude et mon respect.

Je remercie également Docteur Nabi Ibrahim, d'avoir contribué à ce travail et d'avoir répondu présent, par un jour de l'aïd el Adha.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Docteur AIZA Asma, pour son soutien aussi bien professionnel qu'amical, ses précieux conseils et son aide m'ont été inestimables je lui suis reconnaissante.

Enfin, je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de cette thèse. Merci à tous

DEDICACES

Au nom de Dieu, clément et miséricordieux, qui m'a donné la grâce et la force pourachever ce travail. Louange à Allah le tout puissant.

Je dédie cette thèse à la mémoire de mes parents. Vous êtes partis trop tôt mais vous m'avez inculqué les valeurs du travail et de la persévérence. Bien que vous ne soyez plus présents, votre amour et vos enseignements continuent de me guider chaque jour. J'espère que ce travail rend hommage à tout ce que vous avez fait pour moi. Vous me manquez profondément.

Je souhaite exprimer ma gratitude la plus sincère à mon époux, Farouk, pour son soutien indéfectible et son amour constant tout au long de ces années. Ta patience, ta compréhension, et tes encouragements m'ont été inestimables. Tu as su me donner la force de persévérer dans les moments de doute, et célébrer chaque petite victoire. Je te suis profondément reconnaissante. Merci de tout cœur.

Je dédie ce travail à mes enfants, Adam, Fadi et Rostom. Votre présence joyeuse et vos sourires m'ont apporté une énergie inestimable et m'ont souvent rappelé l'importance de persévirer. Merci pour votre patience malgré que mon temps et mon attention étaient souvent accaparés par ce projet. Je suis immensément reconnaissante de vous avoir à mes côtés, vous égarez mon existence.

Je tiens également à remercier mes sœurs, ainsi que leurs maris, de m'avoir aidé chacun à sa manière et d'avoir prié pour moi et soutenu à chaque étape de ce parcours. J'ai de la chance de vous avoir, et d'être toujours votre « petite sœur », puissions-nous rester aussi unis.

Je tiens à exprimer ma gratitude également à tous les membres de ma belle-famille pour leurs encouragements, d'avoir répondu présents lorsque j'avais besoin d'eux, vous avez été d'un soutien inestimable pour moi.

A mes amies, Asma. A, Nabila, Asma. F, et Amina, de m'avoir soutenu dans les moments de doute, pour leur écoute et leurs encouragements et de m'avoir toujours rappelé l'importance de mes aspirations. Merci pour les moments de joie, de rire et de complicité que nous partageons.

A tous ceux qui m'aiment et m'apprécient.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	16
1. ESCHERICHIA COLI	18
1.1.Taxonomie et définition	18
1.2.Habitat	18
1.3.Caractères bactériologiques	18
1.4.Caractères antigéniques	19
1.4.1.Les antigènes O somatiques	19
1.4.2.Les antigènes capsulaires K	19
1.4.3.Les antigènes H	20
1.5.Commensalité et pathogénicité	20
1.5.1.Intestinal pathogenic <i>E. coli</i>	20
1.5.2.Extra-intestinal pathogenic <i>E. coli</i> (<i>ExPEC</i>)	21
2 LA COLIBACILLOSE	22
2.1.Généralités	22
2.2.Les formes de la maladie	23
2.2.1.Maladie respiratoire chronique	23
2.2.2.Colisepticémie	23
2.2.3.Les omphalites	24
2.2.4.Synovites et arthrites	24
2.2.5.Salpingites	25
2.2.6.Coligranulomatose de Hjarre	25
2.2.7.Panophtalmie	25
2.2.8.Syndrome de la tête enflée (swollen head disease)	25
2.2.9. Cellulite	26
2.2.10.Entérites	26
2.3.Pathogénie	26
2.4.Les facteurs de virulence associés	27
2.4.1.Les adhésines	28
2.4.2.La résistance au sérum	31
2.4.3.Les systèmes de captation du fer	33
2.4.4.Les toxines	35

2.4.5.Les auto-transporteurs	35
2.4.6.Colicine	36
2.4.7.Invasines	37
2.4.8.Quorum sensing	37
2.5.Diagnostic	37
2.6. Traitement	38
2.7.Prévention	38
3 LES ANTIBIOTIQUES ET L'ANTIBIORESISTANCE	40
3.1.Les antibiotiques	40
3.2.Utilisation des antimicrobiens en production aviaire	40
3.3.Impact des stratégies thérapeutiques sur la résistance bactérienne	41
3.4.Transfert de résistance	42
3.5.Supports génétiques de la résistance aux antibiotiques	42
3.6.Les principaux antibiotiques et leurs mécanismes de résistance	42
3.6.1.Les β-lactamines	43
3.6.2.Les tétracyclines	51
3.6.3.Aminosides	53
3.6.4.Les quinolones	55
3.6.5.Les sulfamides-triméthoprime	57
3.6.6.Polymyxines	59
3.6.7.Phénicols	62
4 PARTIE EXPERIMENTALE	63
4.1.Problématique et objectif de l'étude	63
4.2.Région et période d'étude	63
4.2.1.Lieu de stage	64
4.3.Méthode	64
4.3.1.Autopsie	64
4.3.2.Prélèvement des organes	64
4.3.3.Isolement des bactéries	65
4.3.4.Identification des <i>E.coli</i>	66
4.3.5.Conservation des souches	67
4.3.6.Caractérisation de la résistance aux antibiotiques	67
4.3.7.Extraction de l'ADN	72
4.3.8.Recherche des gènes <i>mcr</i>	73
4.3.9.Recherche des facteurs de virulence	75

4.3.11.Analyse statistique	80
4.4.Résultats	81
4.4.1. Distribution des prélèvements en fonction de l'âge et du type d'élevage	81
4.4.2.Les lésions retrouvées	81
4.4.3.Identification bactériologique	83
4.4.4.Résultat de l'antibiogramme	84
4.4.5.Résultat des CMI à la colistine	87
4.4.6.Profil de multirésistance	88
4.4.7.Résultat de recherche des gènes <i>mcr</i>	90
4.4.8.Profil de virulence	91
4.5.Discussion	101
CONCLUSION	111
RECOMMANDATIONS	113
APPENDICES	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 4.1 :	Situation géographique des régions d'étude	63
Figure 4.2 :	Prélèvement des organes	65
Figure 4.3 :	Ajustement de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland.	69
Figure 4.4 :	Préparation de la technique CBDE	70
Figure 4.5 :	Control de pureté de l'ADN par Nanodrop	73
Figure 4.6 :	Réaction PCR des gènes <i>mcr</i>	74
Figure 4.7 :	Lésions observées lors de colibacillose.	82
Figure 4.8 :	Colonies d' <i>E. coli</i> sur gélose Hektoen [photo personnelle].	83
Figure 4.9 :	Observation sous microscope optique d' <i>E. coli</i> (Gx100)	83
Figure 4.10 :	Profil biochimique d' <i>E. coli</i> sur une galerie API 20 ^E	84
Figure 4.11 :	Exemple de résultat d'antibiogramme.	85
Figure 4.12 :	Résultat de l'antibiogramme des souches étudiées	85
Figure 4.13 :	contrôle de qualité des disques d'antibiotiques	86
Figure 4.14 :	Absence de profil caractéristique de BLSE	86
Figure 4.15:	Résultats de la technique CBDE	87
Figure 4.16 :	Microplaque de CMI de colistine [photo personnelle]	87
Figure 4.17 :	Résultats de multirésistance des souches d' <i>E. coli</i>	88
Figure 4.18 :	Comparatif de résistance aux antibiotiques chez toutes les souches et chez les souches résistantes à la colistine.	90
Figure 4.19 :	Détection des gènes <i>mcr</i> par PCR multiplex	90
Figure 4.20 :	Fixation du rouge Congo	91
Figure 4.21 :	Résultat du test de résistance au sérum	91
Figure 4.22 :	Résultat des tests d'hémolyse	92
Figure 4.23 :	formation de biofilm sur microplaqué	93
Figure 4.24 :	Résultats de PCR des gènes <i>hlyF</i> , <i>ompT</i> , <i>iroN</i> et <i>iss</i>	95
Figure 4.25 :	Résultat de PCR du gène <i>iutA</i>	96
Figure 4.26 :	Résultat de PCR du gène <i>fimH</i>	96
Figure 4.27 :	Résultat de PCR du gène <i>papC</i>	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1:	Caractéristiques des amorces des gènes <i>mcr</i> .	74
Tableau 4.2:	Interprétation des densités optiques	78
Tableau 4.3:	Caractéristiques des amorces des gènes de virulence.	79
Tableau 4.4:	Répartition des souches selon le type d'élevage et l'âge.	81
Tableau 4.5 :	Fréquence des lésions retrouvées	82
Tableau 4.6 :	Résultat de l'antibiogramme	85
Tableau 4.7 :	Interprétation d'une microplaque de CMI de colistine	88
Tableau 4.8 :	Profil de résistance aux antibiotiques des souches étudiées.	89
Tableau 4.9 :	Valeurs moyennes des DO des isolats testés	93
Tableau 4.10:	Combinaisons des gènes de virulence et des antibiotypes chez les souches résistantes à la colistine.	98
Tableau 4.11 :	Résultats du test d'indépendance	99
Tableau 4.12 :	Résultats du test de Fisher pour les gènes de virulence et le phénotype de résistance aux antimicrobiens.	100

INTRODUCTION

La filière avicole a connu un développement considérable grâce à des programmes mis en place par les pouvoirs publics algériens depuis plusieurs années. Cette filière est principalement dominée par le secteur privé et enregistre une production estimée à 12 Kg / Hab/An en viandes blanches, et à 144 œufs par Hab /An en œufs de consommation [1]. Toutefois, comme pour toute industrie, l'industrie aviaire est soumise à des contraintes parmi eux, une maladie redoutable : la colibacillose.

La colibacillose est considérée comme une maladie majeure affectant l'industrie du poulet en Algérie et dans le monde entier, causant une mortalité élevée et des pertes économiques [2]. Elle affecte souvent les voies respiratoires et évolue vers une infection systémique caractérisée par des lésions d'aérosacculite, de péricardite et de périhépatite. L'infection est favorisée par le stress, la baisse de l'immunité, les co-infections et le manque d'hygiène [3]. La colibacillose est causée par des souches virulentes d'*Escherichia coli*, appelées "E. coli pathogène aviaire" (APEC) [3].

La pathogénicité des isolats d'APEC est liée à la possession de plusieurs facteurs de virulence impliqués dans la colonisation et la survie des bactéries dans l'hôte [4]. Chez les volailles, les APEC possèdent un répertoire distinct de gènes de virulence, ce qui est à l'origine de la diversité génétique de ces souches [5],[6]. Parmi les déterminants de virulence, cinq gènes situés sur le grand plasmide de virulence ColV : *iutA* (transport du fer), *hlyF* (hémolysine), *iss* (survie dans le sérum), *iroN* (chélation du fer par les sidérophores), et *ompT* (protéase de la membrane externe), sont principalement portés par les APEC, et permettent de les distinguer des *E. coli* fécaux chez les volailles [7]. De plus, les gènes de fimbriae sont fréquemment associés aux APEC, facilitant l'adhésion d'*E.coli* aux cellules hôtes et la formation de biofilms [3].

A la recherche de la manière la plus facile pour le contrôle de la colibacillose, et en ignorant les règles d'hygiène, les antibiotiques sont largement utilisés. Ceux-ci

appartiennent à plusieurs classes, et sont utilisés de manière anarchique, à titre préventif et curatif [8].

L'utilisation abusive d'antibiotiques comme stratégie fondamentale pour traiter la colibacillose a conduit à la propagation de la résistance aux antimicrobiens, compliquant ainsi le problème lié à ce pathogène [9]. Aujourd'hui, cette résistance est potentiellement transmise entre les volailles, voire à l'homme via la chaîne alimentaire, ce qui représente un problème de santé publique [10], d'autant plus, qu'il existe des preuves que les souches APEC partagent des facteurs de virulence communs avec l'*E.coli* humain [5]. Il est donc nécessaire de surveiller le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes afin d'optimiser les traitements antimicrobiens chez les volailles et les humains.

Dans le contexte de l'émergence et de la dissémination de la résistance aux antimicrobiens en Algérie, et pour contribuer à la mise à jour des données actuelles sur les déterminants phénotypiques et génotypiques de la virulence et de la résistance aux antibiotiques chez les souches d'APEC, la présente étude a été menée dans le but de (1) déterminer la fréquence de la résistance aux antimicrobiens dans les *E. coli* isolés de volailles atteintes de colibacillose dans le centre de l'Algérie, (2) caractériser les facteurs associés à la virulence.

Notre manuscrit est scindé en deux parties. La première partie est une synthèse bibliographique qui met en exergue trois chapitres :

- Le premier chapitre représente une description de la bactérie *E. coli*
- Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de la colibacillose et des facteurs de virulence portés par *E. coli* impliqué dans l'apparition de la maladie.
- Le troisième chapitre aborde les principales classes d'antibiotiques utilisés dans le secteur avicole, ainsi que les déterminants de la résistance envers ces molécules.

Une seconde partie expérimentale qui énonce le matériel et les méthodes développés afin de réaliser l'objectif de travail. Ensuite les résultats sont présentés et discutés. Nous avons clôturé le manuscrit par une conclusion et quelques recommandations.

CHAPITRE 1

1 *Escherichia coli*

1.1. Taxonomie et définition

Escherichia coli (*E.coli*) a été décrite et isolée pour la première fois, en 1885, par le pédiatre allemand Théodore Escherich [11], à partir de diarrhée chez l'enfant, il l'appela Bacterium coli commune. Suite à une révision de Bacterium, il a été reclassé en *Bacillus coli* par Migula en 1895, puis reclassé plus tard dans le genre nouvellement créé *Escherichia*, du nom de son découvreur original, par Castellani et Chalmers en 1919 [12]. Dans les années 40, Kauffmann a mis au point un schéma de classification sérologique des espèces d'*E.coli* permettant de répertorier les espèces pathogènes basé sur des sérotypes précis [11].

1.2. Habitat

L'espèce *Escherichia coli* est une bactérie communément trouvé dans l'intestin des organismes à sang chaud. Habituellement *Escherichia coli* colonise le tube digestif des nourrissons quelques heures après la naissance où elle coexiste avec l'hôte en bonne santé, tirant un bénéfice mutuel pendant des décennies. Tant que ces souches d'*E. coli* n'acquièrent pas des éléments génétiques codant pour des facteurs de virulence, elles causent rarement des maladies, restent commensales sauf dans certains cas, lorsque le système immunitaire est affecté. [13].

1.3. Caractères bactériologiques

La famille des *Enterobacteriaceae* est une vaste famille regroupant des genres bactériens présentant des caractères bactériologiques communs : ce sont des bacilles droits de 1 à 6 µm de long et de 0.3 à 1µm de large, Gram négatifs. On retrouve *E.coli* isolée ou par paire, parfois mobiles où les flagelles ont une disposition péritricte. Elle est classée comme aéro-anaérobies facultatifs et non sporulées. Elles peuvent acidifier le glucose par voie fermentative avec ou sans production de gaz, elles sont catalase positives, oxydase négatives, et réduisent les nitrates en nitrites.

Elle se développe sur la plupart des milieux gélosés utilisés en laboratoire en 24 heures. La croissance optimale se fait à 37°C en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées, les souches capsulées apparaissent muqueuses. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif.

Les principaux caractères biochimiques positifs sont : indole, ONPG et mannitol, par contre les caractères suivants sont positifs de façon moins constante : LDC, ODC, sorbitol, production de gaz. Sont toujours négatifs : inositol, urée, TDA, VP, citrate de Simmons.

1.4. Caractères antigéniques

Les souches d'*Escherichia coli* peuvent être classées selon 3 composants antigéniques majeurs qui sont : les lipopolysaccharides de surface O, les antigènes capsulaires K, les antigènes flagellaires H et parfois Les Antigènes F fimbrillaires qui sont présents chez les souches ayant les propriétés d'adhésion.

1.4.1. Les antigènes O somatiques

Les antigènes O sont des composés complexes de phospholipides et de polysaccharides qui contiennent une fraction protéique qui rend l'ensemble antigénique. Plus de 176 antigènes somatiques différents ont été identifiés, différents par la fraction terminale de nature polyosidique qui contient un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides de 10 à 25 sucres, leur nature et leur ordre sont responsable de la diversité et de la spécificité des antigènes O [14]. Ils ne sont pas dénaturés par le chauffage à 121°C. Ces antigènes sont agglutinants en utilisant un immun sérum spécifique permettant le sérogroupage, les bactéries peuvent ne plus exprimer l'antigène O après des repiquages successifs passant des colonies lisses S « smooth » à des colonies rugueuses R « rough » [14],[15]

1.4.2. Les antigènes capsulaires K

En 1945, Kauffmann et Vahlne ont introduit le terme antigène K (de l'allemand Kapsel qui veut dire capsule) comme symbole pour désigner les antigènes d'enveloppe ou de capsule, dont trois types différents avaient été décrits les antigènes L, A et B.

L'antigène L c'est le plus fréquent, il masque l'antigène O, de ce fait, le sérogroupage ne peut se faire qu'après destruction de cet antigène par chauffage à 100°C pendant 30 minutes. **L'antigène A** est plus rare et correspond véritablement à l'antigène capsulaire. Il est thermostable, en effet il faut augmenter la température à 121°C pendant 30 minutes pour le détruire. **L'antigène B** sa température de dénaturation se trouve intermédiaire entre les deux antigènes précédemment cités [12],[16].

1.4.3. Les antigènes H

On les appelle antigènes flagellaires, ils peuvent différer entre différentes espèces, ou au sein d'une même espèce, cette diversité est liée à la flagelline, une protéine spécifique constituant le flagelle. Le typage est réalisé que par quelques laboratoires spécialisés. Les antigènes H démontrent rarement des réactions croisées. De plus, il est courant que l'inagglutinabilité de H peut être inhibée par des changements dans le milieu ou la température de croissance [16].

Mabeck, Orskov & Orskov ont découvert que les symptômes de la pyélonéphrite aiguë n'étaient pas corrélés avec des antigènes H particuliers, mais que certains sérotypes d'*E.coli*, à savoir O2:K1:H4, O4:K12:H15 et O6:K2ac:H1, étaient associés à la fréquence disproportionnellement élevée de pyélonéphrite aiguë[17].

1.5. Commensalité et pathogénicité

Escherichia coli coexiste normalement dans le tractus gastro intestinal de l'homme, des mammifères et des oiseaux, où elle interagit avec son hôte, tirant un profit mutuel l'un de l'autre. En dépit, du fait que la plus part des *E. coli* sont non pathogènes, certaines sont capables de devenir pathogènes en exprimant des facteurs de virulence spécifiques. Les souches pathogènes peuvent être divisées en deux groupes selon le lieu d'invasion. Les *E.coli* pathogènes intestinaux et les *E.coli* pathogènes extra-intestinaux [18],[19].

1.5.1. Intestinal pathogenic *E. coli*

L'infection par *Escherichia coli* intestinale chez l'homme se fait principalement par ingestion d'aliments ou d'eau contaminée. La classification des pathovars de ce groupe est basée sur le type de la maladie causée et des facteurs de virulence associés, les 6 types principaux sont : les ETEC (*E. coli* Entérotoxinogènes), les

EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques), les EPEC (*E. coli* entéropathogènes), les DAEC (*E. coli* à adhérence diffuse), les EAEC (*E. coli* entéroagrégatives) et les EIEC (*E. coli* entéroinvasives) [13].

1.5.2. Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC)

Comme pour les souches intestinales, ces souches sont retrouvées dans le tractus gastro intestinales mais sont incapables de causer une maladie intestinale [20].

Cependant, ces souches sont dotés de facteurs de virulence leur permettant d'échapper au système immunitaire, en allant envahir d'autres systèmes comme l'arbre urinaire ce sont les *E.coli* uropathogènes (UPEC), ou la barrière méningée à l'origine des méningites néonatales (NMEC), comme elles peuvent entraîner des septicémies (SePEC). Elles sont aussi responsables chez les l'espèce aviaire d'une maladie redoutable, la colibacillose, ce sont les *E.coli* pathogènes aviaires (APEC)[21].

CHAPITRE 2

2 LA COLIBACILLOSE

2.1. Généralités

Les *E.coli* pathogènes aviaires (APEC) sont responsables d'infections systémiques ou localisées [22]. La maladie peut se manifester sous différentes formes comme : infections du sac vitellin (omphalites), infections du tractus respiratoire (aerosacculite), péricardites et périhépatites, synovites et arthrites, coligranulomatose, swollen head disease, salpingites [3]. Elles sont responsables de mortalités, baisse de performances et des saisies à l'abattoir [2].

L'APEC peut affecter toutes les espèces de volailles dans tous les types de systèmes de production [23]. L'APEC est également répandue dans tous les groupes d'âge de poulets, mais les poulets de chair âgés de 4 à 6 semaines sont plus sensibles [24]. Les poules pondeuses peuvent être affectées pendant toutes les périodes d'élevage et de production, mais elles sont plus exposées à la maladie autour du pic de ponte et à la fin de la période de production d'œufs. *E.coli* peut agir comme agent pathogène primaire ou secondaire. [3].

La sévérité de la maladie est dépendante de la présence de facteurs de prédisposition comme le statut immunitaire (maladie immunosuppressive due à la maladie de Gumboro), la présence de maladies concomitantes comme les maladies virales (New Castle, bronchite infectieuse, influenza aviaire) ou bactériennes (*Mycoplasma gallisepticum*) [22], mais aussi, d'autres facteurs environnementaux comme le stress ou un taux élevé d'ammoniac. Les oiseaux peuvent être infectés par inhalation de poussières contaminées par *E. coli* excrétées par les sujets infectés, les bactéries peuvent par la suite coloniser l'arbre respiratoire supérieur puis profond, et en raison de l'absence de séparation anatomique entre les différents appareils, celles-ci peuvent atteindre le compartiment sanguin et les organes (foie, cœur, intestin, grappe ovarienne) [11].

Les poulets atteints de colibacillose ont des signes de détresse respiratoire, fièvre, perte d'appétit, retard de croissance accompagné de mortalité [25].

2.2. Les formes de la maladie

2.2.1. Maladie respiratoire chronique

Lorsque l'origine est respiratoire, *E.coli* atteint la circulation générale après avoir franchi la muqueuse respiratoire, suite à la présence d'agents prédisposant comme les maladies virales, les mycoplasmes ou les fortes teneurs d'ammoniac, il en résulte une atteinte des sacs aériens (aerosacculite), ou ce qu'on appelle aussi maladie respiratoire chronique [26].

Les premiers symptômes consistent en une chute brutale de la consommation alimentaire, suivie d'une hyperthermie, accompagnés de symptômes respiratoires (jetage, larmoiement, râles) allant jusqu'à la détresse respiratoire [27].

Les lésions sont situées au niveau de l'arbre respiratoire (trachée, poumons, sacs aériens), du sac péricardique et cavités péritonéales caractérisés par des sérosités. Les sacs aériens sont épaissis présentant un exsudat caséux. Microscopiquement, on retrouve un œdème, et une infiltration d'hétérophiles, les phagocytes mononucléaires sont fréquentes 12h après l'inoculation, plus tard les macrophages deviennent nombreuses avec des cellules géantes en marge des zones nécrotiques [22].

2.2.2. Colisepticémie

La colisepticémie est définie par la présence d'*E. coli* dans la circulation sanguine, c'est une infection à point de départ synovial, néonatal mais le plus souvent respiratoire [28].

Les lésions caractéristiques à l'autopsie sont : la coloration verdâtre des tissus, une odeur caractéristique probablement due à la production d'indole. La bourse de Fabricius est retrouvée enflammée ou atrophiée [29].

La colisepticémie est souvent accompagnée de péricardite, les vaisseaux du péricarde deviennent proéminentes en raison de l'hyperémie et le péricarde devient opaque et œdémateux [29].

Les lésions de la forme aigüe sont non exsudatives, par la suite, un exsudat pale s'accumule à l'intérieur du sac péricardique suivi d'un exsudat fibrineux ; en ce qui concerne les autres organes comme le foie et la rate, elles sont le siège d'un

œdème, de la congestion ainsi qu'un dépôt de fibrine allant jusqu'à avoir un aspect d'une crêpe [22],[30].

Sur le plan microscopique, on observe d'abord un exsudat séreux et sérofibrineux, suivi d'une infiltration d'hétérophiles. Dans un second temps, on observe l'apparition de macrophages, de bactéries et de cellules géantes entourant les zones de nécrose. Les lésions sont alors caractérisées par la présence d'hétérophiles, de cellules géantes et de débris nécrotiques caséieux [22].

Les principales séquelles de la colisepticémie sont : les méningites/encéphalites, panophtalmies, arthrites /polyarthrites, synovites/ténosynovites, salpingites, ostéomyélites [27],[29]

2.2.3. Les omphalites

La contamination se fait précisément lors du passage de l'œuf par le cloaque, celui-ci contenant des *E. coli* qui viennent se déposer à la surface de l'œuf, puis pénètrent à travers les membranes coquillères et contaminent la membrane vitelline, des mortalités embryonnaires sont constatés quelques jours avant l'éclosion et se poursuivent après jusqu'à 3 semaines [3],[30]. La mortalité due à l'omphalites peut atteindre 20%, ceux qui survivent présentent fréquemment des lésions de perihépatite, et de péricardite indiquant le développement d'une colisepticémie [27]. Dans les cas graves la paroi corporelle et la peau sus-jacente subissent une lyse et sont mouillées et sales [22].

Sur le plan lésionnel, on observe, un abdomen distendu, un retard de résorption du sac vitellin avec un contenu allant du vert à marron, une splénomégalie et des poumons congestionnés. Ces organes ainsi que les proventricules prennent une couleur foncée. Microscopiquement, on note au niveau de la paroi du sac vitellin, un œdème accompagnée d'une légère inflammation, la présence d'hétérophiles, de macrophages, de cellules géantes, et de bactéries [24].

2.2.4. Synovites et arthrites

Elles peuvent être secondaires à d'autres infections (arthrites à *Réovirus*, synovite à *Mycoplasma synoviae*), ou le résultat d'une inoculation lors de blessures ou des traumatismes ou être une séquelle de colisepticémie, dans ce cas, les poulets n'ont pas pu éliminer la bactérie. Les oiseaux ont comme conséquences, une

boiterie ainsi qu'un retard de croissance. La reproduction de la maladie peut être réalisée par inoculation veineuse ou des sacs aériens [30].

2.2.5. Salpingites

Les salpingites sont à l'origine de mortalités sporadiques et d'une baisse de la production d'œufs, elles sont majoritairement le résultat d'infections ascendantes à partir du cloaque, il existe une prédisposition d'infection si la volaille est infecté simultanément par des virus (bronchite infectieuse) ou des mycoplasmes [5]. La maladie semble être favorisée par les fortes productions d'œufs ou des œufs de gros calibre et l'activité oestrogénique ce qui provoque un relâchement du sphincter se situant entre le vagin et le cloaque [31]. Les conséquences peuvent aller jusqu'à la ponte intra abdominale d'œufs suite à l'amincissement de la paroi de l'oviducte, celui-ci présente une masse caséuse donnant un aspect de jaune d'œuf coagulé, avec de nombreux hétérophiles et de la fibrine [30].

Les isolats semblent arborer les fimbriae de type P et sont plus souvent de sérotype O78 [13].

2.2.6. Coligranulomatose de Hjarre

Cette forme est caractérisée par de nombreux granulomes situés dans le mésentère, le foie, le duodénum, le caecum mais pas dans la rate, ce qui permet de poser un diagnostic différentiel avec la tuberculose [32]. C'est une forme rare, mais peut être à l'origine de mortalités sporadiques voire importantes. Sur le plan microscopique, on retrouve seulement des hétérophiles et parfois des cellules géantes dans les zones nécrotiques [22].

2.2.7. Panophthalmie

Ce type de localisation est peu commun. L'infection concerne un seul œil, il est inflammé, trouble à opaque, plus tard on assiste à un rétrécissement de l'œil. Un exsudat fibrineux avec présence d'hétérophiles et de nombreuses bactéries sont présents dans tout l'œil [22].

2.2.8. Syndrome de la tête enflée (swollen head disease)

C'est une forme d'inflammation touchant les cellules de la peau et du tissu sous-cutané de la tête et des régions périorbitaires. Très souvent, l'infection est

secondaire à des infections prédisposantes comme les virus (bronchite infectieuse, rhinotrachéite infectieuses et New Castle) et aggravée par des teneurs élevées d'ammoniac [3]. La porte d'entrée est souvent les conjonctives ou les muqueuses des sinus nasaux. Les conséquences sont essentiellement des retards de croissance [30].

Les lésions consistent en l'apparition d'un œdème de la tête et de la région périorbitaire, d'une inflammation diffuse, et d'un exsudat caséux dans le tissu conjonctif de ces régions ainsi qu'au niveau des glandes lacrymales [33].

2.2.9. Cellulite

Elle peut avoir plusieurs origines, mais *E. coli* est très souvent la bactérie prédominante, elle est favorisée par le surpeuplement et les mauvaises conditions d'hygiène [5]. Cette forme de colibacillose représente un problème majeur chez le poulet de chair, en raison des saisies à l'abattoir. C'est une inflammation du tissu sous-cutanée généralement au niveau inférieur de l'abdomen ou sur les cuisses [34].

2.2.10. Entérites

Bien que fréquente chez les mammifères, celle-ci est rare chez la volaille et probablement, due à d'autres microorganismes. Les rares études attestent que la diarrhée résulte d'une infection par *E. coli* entéro-toxinogène (ETEC), entéro-hémorragique (EHEC), entéro-pathogénique (EPEC), ou entero-invasive (EIEC); chaque type se distingue de l'autre par l'expression de certains facteurs de virulence qui déterminent la virulence et le type d'entérite [35]. Les EHEC et les EPEC produisent des lésions d'attachement-effacement sur les muqueuses intestinales. Les volailles atteintes peuvent présenter de la diarrhée avec des intestins pales, surtout les caeca, qui sont remplis de liquide parsemé de mucus. Tandis que les ETEC produisent des toxines, Les EIEC seraient responsables de septicémies néonatales [22],[35].

2.3. Pathogénie

La porte d'entrée principale des bactéries est la voie respiratoire par inhalation des *E. coli* présents dans l'environnement, l'inoculation peut aussi se faire via des plaies ou des ouvertures dans la peau. Divers facteurs d'adhésion (adhésines

fimbriaires et non fimbriaires), sont produits par les *E. coli*, et qui permettent à la bactérie d'adhérer aux muqueuses, et de se reproduire par la suite [5].

Les souches virulentes sont capables de traverser la muqueuse, en particulier si la barrière a été compromise par des agents irritants ou des virus, et de survivre dans le milieu interne de l'organisme. Une fois que les *E. coli* ont atteint les voies systémiques, ils sont rapidement détruits par les macrophages et les hétérophiles à moins qu'ils soient équipés de systèmes leur permettant de survivre dans cet environnement hostile. L'endotoxine diminue également la capacité bactéricide des macrophages pulmonaires ce qui peut contribuer à la survie et la dissémination d'*E. coli* [36].

Une fois disséminé, le liquide commence à s'accumuler dans les cavités corporelles, suite à l'augmentation de la perméabilité vasculaire favorisée par l'inflammation qui a été initiée par l'avènement des hétérophiles [37], les facteurs chimiотactiques attirent les hétérophiles et un exsudat caséux devient visible, cet exsudat va augmenter et subit une caséification, les dommages ainsi causés peuvent entraîner la fibrose aux tissus [38].

En effet, Les lésions sévères sont inversement proportionnelles à la virulence. Les souches très virulentes provoquent la mortalité si rapidement que les lésions sévères ont peu de temps pour se développer, alors que les oiseaux infectés par des souches moins virulentes survivent plus longtemps et développent des lésions plus étendues [30],[36].

2.4. Les facteurs de virulence associés

Il est souvent admis que les souches APEC sont des agents de surinfections secondaires, mais, l'acquisition de facteurs de virulence, leur a permis de se comporter comme des pathogènes. Un nombre important de facteurs de virulence a été identifié chez les APEC, ils permettent de les différencier des souches commensales et déterminent leur pathogénicité [27].

Ces facteurs de virulence incluent : la capacité des bactéries d'adhérer aux muqueuses, l'invasion des cellules de l'hôte, les systèmes d'acquisition du fer à partir des liquides organiques, les toxines, la survie dans les macrophages,

l'hémagglutination, la résistance des bactéries aux défenses immunitaires et la formation de biofilms [3].

2.4.1. Les adhésines

Les adhésines sont des formations situés à la surface des bactéries, ils permettent l'adhésion aux cellules hôtes, qui représente une étape essentielle dans la pathogenèse [39].

Les adhésines ont été proposés pour la première fois par Arp et Jensen, après avoir remarqué une persistance de souches virulentes d'*E.coli* pourvu de fimbriae dans la trachée de dindons. Plusieurs classifications ont été proposés dont celle de Orskov et Orskov [17], qui se base sur leur ultrastructure [40].

Certaines adhésines sont associés à la surface de la bactérie ils sont nommés : les adhésines afimbriaires, d'autres sont assemblés en filaments et s'étendent de la surface cellulaire, ce sont les adhésines fimbriaires [32].

2.4.1.1 Les adhésines fimbriaires

a. Les fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont impliqués dans la colonisation initiale, ils se fixent aux cellules épithéliales de la trachée, et des sacs aériens [18].

Les fimbriae de type 1 sont codées par un cluster de 9 gènes dont 7 sont présents sur le même opéron (Mainil, 2013). Structurellement, ils sont constitués de deux parties : la tige et la partie fibrillaire, la première est nommée FimA, alors que la partie fibrillaire est constituée de plusieurs sous-unités dont fimH, qui est situé à la partie terminale. Il a été démontré que l'adhésine FimH (codée par le gène *fimH*) est responsable de la spécificité pour les récepteurs de type mannose portés par les cellules hôtes [41].

Les fimbriae 1 se lient aux récepteurs riches en mannosides des cellules épithéliales de la trachée et des poumons, ils sont fréquemment isolés des APEC [32]. Malgré le fait que le rôle de ces fimbriae dans la colonisation a été démontré *in vivo* [42],[43], une expérience a montré qu'un mutant *fim* était capable de coloniser les muqueuses au même titre que la souche parentale [44]. Paradoxalement, une autre expérience, qui a utilisé des mutants *fimH* dont la

propriété d'adhérence a été délesté, a montré une augmentation de l'adhérence de ces souches à la muqueuse trachéale [45].

b. Fimbriae P

Les fimbriae de type P sont morphologiquement très proches des fimbriae de type 1, ils se définissent sur la base de leur propriété d'agglutination des globules rouges humains [27].

Les fimbriae P ont été décrit pour la première fois chez les UPEC, elles permettent l'adhérence de ces souches aux cellules de l'arbre urinaire causant des pyélonéphrites. Ces fimbriae sont également décrit chez les APEC, même s'ils ne sont exprimés que par une faible proportion d'isolats, ils sont plus souvent associés aux infections profondes plus précisément, la colisepticémie. En effet, il semblerait que la présence des séquences d'ADN des gènes *pap* est significativement plus fréquente chez les poulets septicémiques que les poulets sains[3].

Le rôle des fimbriae P dans la pathogénicité des APEC n'est pas complètement élucidé. En effet, ces fimbriae ne sont pas impliqués dans l'adhérence aux cellules de la trachée et du pharynx, suggérant que leurs récepteurs n'y sont pas présents [32].

Pourbakhsh et al., ont démontré que ces adhésines ne sont pas exprimées lorsque les bactéries colonisent la trachée, par contre, les bactéries colonisant les sacs aériens, les poumons et les organes internes expriment les fimbriae P (Pourbakhsh et al., 1997). Ceci, confirme les fimbriae P subissent une variation de phase *in vivo* qui est dépendante de leur localisation chez l'hôte et supporte encore plus l'hypothèse selon laquelle les fimbriae P ne sont pas important dans les premières phases de colonisation du tractus respiratoire supérieur, mais interviennent plus tardivement dans le processus de l'infection [3].

c. Fimbriae S

Les fimbriae de type S, sont capables d'agglutiner les érythrocytes humains n'appartenant pas au groupe P. Les fimbriae de type S reconnaissent les récepteurs à acide neuraminique qui sont des oligosaccharides de type

« Sialylgalactoside » d'où leur nom « fimbriae S », ils sont composés par des sous unités codées par un cluster de gènes sfa/foc [46].

Des souches invasives aviaires produisent des fimbriae AC/I (" Avian *E. coli* I "), proches des fimbriae Sfall [46],[47], leur rôle n'est pas complètement établi mais il semblerait qu'ils soient des médiateurs de l'adhérence des APEC aux tissus épithéliaux aussi bien *in vivo* que *in vitro* [32]. Ils n'ont été retrouvés que chez certaines souches de sérogroupe O78 [48].

d. Les curli

Les curli sont des structures filamenteuses, agrégatives retrouvées à la surface des bactéries *E. coli* et *Salmonella* spp. Ces structures sont capables de lier la fibronectine, la lamine, le plasminogène, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) et le rouge Congo [30].

La sous unité majeure du curli est codé par le gène *csgA*. Malgré que La majorité des *E. coli* possèdent ce gène, il n'est pas exprimé chez toutes les souches dans les conditions *in vitro* [30]. Dho moulin et Fairbrother., 1999 ont trouvé que parmi 300 *E. coli* isolés de poulet malades, 298 exprimait le gène *CsgA* [3]. Maurer et al., 1998 a montré que seulement la moitié des souches produisent des curli [49].

Le rôle des curli dans la l'adhérence et la colonisation a été déduit de leur capacité à fixer différentes protéines du sérum et le CMH, ce dernier étant présent sur la majorité des cellules des vertébrés [3]. Les curli seraient aussi responsables de la persistance des APEC dans les caeca [50].

2.4.1.2 Les adhésines afimbriaires

Des observations ont été faites sur la capacité des souches d'*E. coli* non productrices d'appendices, à agglutiner les érythrocytes, il s'agit en fait, d'adhésines afimbriaires regroupant les adhésines vraies comme Afa, Dr, M, des structures entourant la cellule bactérienne en forme de capsule comme Nfa et des fibrilles comme F1845, ils sont codés par des gènes plasmidiques ou chromosomiques [11].

Les adhésines afimbriaires sont communément associés aux pathogènes d'*E. coli* des mammifères, toutefois, ce type d'adhésines est également détecté chez des souches aviaires comme l'afa-8, celui-ci est communément associé à la virulence

chez le poussin d'un jour. Le cluster de gènes afa-8 a été aussi isolé chez des souches pap négatives [46].

Stordeur et al., ont montré que les souches exprimant le gène afa-8 sont responsables de l'induction d'une colibacillose comme les souches f17 positives ou pap positives [23].

2.4.2. La résistance au sérum

La résistance à l'effet bactéricide du complément dans le sérum est une caractéristique commune aux APEC, elle est liée à plusieurs facteurs comme la capsule, le lipopolysaccharide (LPS), les protéines de la membrane externe OMPs, dont ompA, iss, traT. Ainsi, il a été démontré, qu'une corrélation existe entre la résistance au sérum et la virulence des souches [3].

- Les protéines de la membrane externe

traT et iss sont codés par une région située sur le plasmide colV, par les gènes du même nom. Ce sont deux lipoprotéines qui sont associés à la résistance des *E.coli* au complément et à la virulence [32]. Il paraît que traT empêche le dépôt du complexe d'attaque membranaire du complément et inhibe la formation du complexe C5bC6 par un mécanisme inconnu [51].

Cependant, le rôle de traT dans la virulence semble limité et associé à d'autres gènes de virulence, par contre, le gène iss est plus fréquemment rencontré chez les APEC [27],[30].

Le rôle de iss dans la virulence d'*E.coli* a été démontré à plusieurs reprises, dans une étude comparative de 294 APEC et de 75 souches fécales issus d'oiseaux apparemment sains, pour la présence de capsule, LPS, ompA, traT et iss, il ressort que iss est significativement plus fréquent chez l'APEC par rapport aux souches commensales [22].

La protéine iss a été décrite pour la première fois par Binns et ses collaborateurs en 1979, ils ont démontré le rôle de iss dans la résistance au complément, où ils ont conclu que la présence de iss multiplie par 100 la virulence d'*E.coli* chez le poussin d'1 jour et de 20 fois la résistance au complément [52]. Tivendale et al. 2004, ont établi une forte association entre la virulence des APEC et le portage de iss et/ou iucA qui est un gène de l'opéron aerobactine [53]

- La capsule

Environ 80 capsules polysaccharidiques (antigène K) ont été décrites chez les *E.coli*, elles sont chimiquement différentes [3]. Cependant, un nombre limité parmi ces capsules peuvent causer des infections invasives. L'antigène K1 est fréquemment associé aux souches APEC les plus pathogènes (O1 et O2), mais aussi de certaines souches non typables [30].

La présence de K1 est responsable de l'échappement immunitaire chez les bactéries. Il a été démontré que l'antigène K1 contient de l'acide N-acétyl-neuraminique faiblement immunogène, celui-ci est capable d'interagir avec le système du complément en empêchant l'activation de la voie alterne ce qui facilite l'évasion bactérienne de la phagocytose et par conséquence d'augmenter la survie bactérienne [32],[54].

- Le LPS

Le LPS est constitué de trois parties, le lipide A, le core et l'antigène O, ce dernier est situé à la partie distale du LPS, il responsable de la spécificité antigénique du LPS [3]. Il existe 170 structures d'antigènes O produits par *E.coli*, sa présence rend le LPS lisse, par contre sa perte rend le LPS rugueux, cette caractéristique est déterminante pour le dépôt du complexe C5b-C8 dans la membrane bactérienne avant la fixation du composant C9 qui ne se fait de manière stable que si la souche produit des antigènes O [27].

Le LPS peut activer la voie alternative de la cascade du complément. En effet, La résistance à l'effet bactéricide du complément est aussi le résultat de la structure des chaînes latérales des antigènes O somatiques, dont les ramifications bloquent le dépôt du facteur C3b. La résistance au sérum semble être médiée par les chaînes latérales du polysaccharide de l'antigène O (Mainil, 2003).

Mellata *et al.*, 2003 ont démontré que le remplacement de l'antigène O78 chez la souche X7122 par les antigènes O1 ou O26 rendait les dérivés de cette souche sensible au sérum [8]. Aussi, certains gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS ou du lipide A facilitent la survie intracellulaire et la résistance à la phagocytose [55].

2.4.3. Les systèmes de captation du fer

Le fer est un oligo-élément essentiel à la survie et à la croissance des bactéries, c'est un cofacteur essentiel dans les réactions biochimiques aussi bien chez les mammifères que chez les microorganismes. Sa concentration dans les liquides physiologiques est élevée mais le fer libre, seule forme utilisable par les bactéries, est présent en très faibles quantités (10^{-18} molaire) [30]. En effet, le fer ferreux libre est toxique, de ce fait pour éviter sa toxicité et pour améliorer sa solubilité, il est lié à des protéines de transport, ainsi, son utilisation par les bactéries sera limitée ce qui va, par conséquent, empêcher leur croissance [55]. Les protéines de transport sont principalement, dans le milieu extracellulaire, la transferrine dans le plasma, le liquide céphalorachidien et les granules des neutrophiles, la lactoferrine dans le lait et les larmes, et dans les cellules, ce sont principalement, la ferritine et l'hème de l'hémoglobine [3].

Pour pallier à l'insuffisance de fer, les bactéries se sont équipées de systèmes leur permettant de fixer ce fer et de le transporter. De ce fait, la capacité des APEC à séquestrer le fer à partir des liquides biologiques représente un indicateur de virulence [27].

Un certain nombre de sidérophores existent chez les bactéries à Gram négatif, elles donnent aux bactéries le pouvoir de rentrer en compétition avec les protéines qui transportent le fer. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire permettent de chélater le fer à partir du milieu extérieur et de le transporter à l'intérieur de la bactérie [56].

Parmi les sidérophores les plus connus sont l'entérobactine, aussi connu sous le nom d'entérocholine, qui a été décrit pour la première fois dans les années 1970 [57]. C'est un cathécol, ayant une forte affinité pour le fer ferrique. La synthèse d'entérobactine est induite lors d'une restriction en fer par le système Fur (**Ferric Uptake Regulation**) [57].

Cependant, l'entérobactine peut être séquestré par la lipocaline 2 (sidérochaline), qui est une protéine secrétée par les polynucléaires neutrophiles, elle intervient dans l'immunité innée et permet d'inactiver l'entérobactine, rendant, ainsi, le fer inaccessible pour les bactéries [57].

De ce fait, il existe d'autres stratégies pour capter le fer, en effet, la salmochéline qui résulte de la glycosylation de l'entérobactine par une glycosyltransférase codée par le gène *iroA*, ne peut pas être captée par la lipocaline 2. La salmochéline, homologue à celle de *S.enterica* serovar *typhymurium* est codée par le locus *iroBCDEN*. Dans ce système, le fer joue le rôle de répresseur à l'expression de *iroN*, dont le promoteur est indépendant du reste des gènes *iro* [58].

L'aerobactine c'est un hydroxamate, d'abord caractérisé chez *Aerobacter aerogenes*, il se trouve sur le plasmide colV qui regroupe d'autres gènes de virulence. C'est un système qui comprend des gènes pour la synthèse du sidérophore hydroxamate aérobactine (codé par les gènes iucABCD) et pour l'absorption de l'aérobactine ferrique (iutA) [32] dont le récepteur du même nom est situé dans la membrane externe de la bactérie [40].

Beaucoup d'études ont confirmé que 73 à 98% des souches APEC expriment le gène de l'aerobactine, contrairement aux souches non pathogènes [3].

La capacité des APEC à séquestrer le fer à partir des liquides biologiques est liée à la léthalité chez le poussin d'un jour [32],[59], il a été montré que l'injection péritonéale de souches sauvages à des souris, après insertion du gène de l'aerobactine dans ces souches dont le plasmide colV a été déleté, est suffisant pour les rendre pathogènes [40].

Un autre type de chélateur du fer a été décrit, il s'agit de la yersiniabactine, peu d'éléments sont connus sur cette molécule, elle a été initialement décrite chez *Yersinia* puis elle s'est disséminée parmi les *Enterobacteriaceae*. L'opéron de la yersiniabactine est situé sur le chromosome PAI [30]. Les gènes codant pour l'absorption de la yersiniabactine ferrique (fyuA) et la protéine répressible du fer (irp2) ont été détecté chez plus de 65% des souches APEC, ce qui suppose qu'elle jouerait un rôle dans la virulence de ces souches [60].

Il existe aussi d'autres systèmes, ce sont les systèmes de transport du fer sitABC et un système de transport du fer putatif nouveau pour l'APEC (eit) [61].

Le système SitABCD est un transporteur de type ABC des ions divalents fer et manganèse, homologue à celui de *Salmonella enterica*, il est situé sur le plasmide

colV et il est similaire au gène chromosomique sitABCD de *Shigella* spp. [62]. Ce système pourrait médier la résistance au stress oxydatif, probablement requise durant l'interaction avec les phagocytes [32].

2.4.4. Les toxines

Les toxines sont des molécules biologiques synthétisées par les bactéries, elles causent des dommages aux tissus et facilitent la colonisation, la motilité, la formation des vésicules dans la membrane externe et la formation de biofilms [39].

Plusieurs toxines sont produits par les APEC comme : ***hlyF*** (putative avian hemolysin), ***vat*** (vacuolating autotransporter toxin); ***ehxA*** (enterohaemolysin); ***cnf1*** (cytotoxic necrotising factor 1); ***cvaC*** (microcin ColV); ***cdt*** (cytolethal distending toxin); ***sat*** (secreted autotransporter toxin), ***VT2y*** (verocytotoxine), et ***astA*** (heat-stable enterotoxin) [55]. Les gènes de Shiga toxines ont été retrouvé chez *E.coli* mais leur expression est limitée au syndrome de la grosse tête [63].

D'autres gènes (*hly*, *cdt* and *cvaC*) sont portés par le plasmide colV et par conséquent, peuvent être transféré à d'autres bactéries [5],[18]. Parmi eux, celui qui représente la marqueur moléculaire des APEC est le gène de l'hémolysine F (*hlyF*), il est considéré parmi les gènes les plus fréquemment rencontrés [39],[64], même si que son rôle dans la pathogénicité n'est pas encore complètement clair, il paraît qu'il favorise le développement de la colibacillose en libérant les gènes de virulence chez l'hôte, et ceci, par la sécrétion de vésicules qui vont jouer un rôle de canal au travers de la membrane externe [65].

2.4.5. Les auto-transporteurs

Les auto-transporteurs monomériques sont affiliés au système de sécrétion de type V. Ils sont appelés ainsi car toute l'information nécessaire pour la sécrétion de la protéine est présente sur le même polypeptide. Ils sont synthétisés dans le cytoplasme comme toutes les autres protéines [66].

Il existe plusieurs sous familles des auto-transporteurs parmi eux, on cite les SPATE (sérine protéase autotransporters of *Enterobacteriaceae*), comme leur nom l'indique, ils ont une activité sérine protéase et sont codés par des gènes situés sur des éléments mobiles comme des plasmides ou des îlots de

pathogénicité. Les SPATE's ont la particularité d'être influencés par les facteurs environnementaux comme la température ou le pH [66].

2.4.5.1 Température sensitive hémagglutinine

L'hémagglutinine sensible à la température (*tsh*) est codée par le gène du même nom (*tsh*), et retrouvée sur le plasmide colV, elle a été observée chez l'APEC en 1994 par Provence et Curtiss. C'est une protéine qui permet d'agglutiner les érythrocytes à des températures basses (26°C à 30°C), elle est réprimée à 42°C [3].

Dans l'étude de Maurer et al., Il a été démontré que Le gène *tsh* est présent chez 46% des souches pathogènes aviaires, contre zéro, chez des souches non pathogènes. Dans une autre étude par Dho moulin et al., ils ont trouvé que parmi les souches positives au gène *tsh*, 90.6% étaient des souches pathogènes [3].

Cette protéine a une double fonction ; une fonction d'adhésion aux cellules épithéliales qui est observée durant les premiers stages de l'infection et une activité protéolytique [32],[66]. En dépit du fait qu'elle est considérée comme un marqueur moléculaire des APEC, son rôle précis n'est pas encore complètement élucidé [18].

2.4.5.2 Protéine Vat

La protéine Vat est codée par le gène du même nom (*vat*) sur l'ilot de pathogénicité PAI des APEC, c'est une sérine protéase qui a été découverte chez une souche d'*E.coli* responsable de septicémie. Elle est responsable de l'activité cytotoxique contre les cellules du rein et les fibroblastes des embryons de poulet et contribue de ce fait, à la virulence des ExPEC [32],[63].

2.4.6. Colicine

Les colicines font partie des bactériocines qui sont des toxines antimicrobiennes produits par de nombreuses espèces bactériennes, elles agissent sur les bactéries de la même espèce ou du même genre en inhibant la croissance bactérienne et en interférant avec la formation de la membrane [67]. Les plasmides qui codent pour ces colicines sont désignés : Col [40](Mainil, 2003). Ces plasmides sont fréquemment rencontrés chez les APEC contrairement aux AFEC ; cependant la production de colicine V ne constitue plus un marqueur

épidémiologique pour les souches invasives, car pourront être liés à la présence d'autres gènes portés par ce plasmide [68].

2.4.7. Invasines

L'accès des APEC à la circulation sanguine est resté une énigme, car sachant que les poumons ne sont pas doués de défense immunitaire, ce sont les hétérophiles et les macrophages circulants qui assurent sa protection, des expériences ont suggéré que ceux-ci transportent les *E.coli* dans la circulation sanguine. Une autre hypothèse serait que, Les *E.coli* peuvent rejoindre le sang par les lymphatiques pulmonaires (Pourbakhsh et al., 1997) [36].

En 2001, Kim et al., ont démontré que la pénétration de la barrière hémato-encéphalique se fait, entre autres, par le groupe de gène *ibeA* chez les ExPEC [69], à partir de ces travaux, d'autres travaux montrent que le gène *ibeA* joue un rôle similaire chez les APEC [70].

Des travaux ultérieurs ont révélés que le gène *ibeA* est plus prévalent chez les souches APEC que les souches commensales [70], et la capacité des APEC à entraîner la colibacillose est réduite chez les souches dont le gène *ibeA* a été inactivé. Le gène *ibeA* est retrouvé chez 14 à 20% des souches APEC, faisant de lui un marqueur des APEC [27].

2.4.8. Quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un système de communication intercellulaire basé sur des auto-inducteurs (petites molécules organiques semblables à des hormones) chez les bactéries, qui régule l'expression de divers gènes associés à la motilité, à la formation de biofilms, à la virulence et à d'autres facteurs. La QS dans l'APEC est médiée par une molécule auto-inductrice-2 (AI-2) synthétisée par *LuxS* et régulée par l'opéron LsrABCDGFK [55].

2.5. Diagnostic

Le diagnostic est basé sur l'observation de lésions typiques associées à l'isolement et l'identification d'*E.coli* [27]

L'isolement de l'agent pathogène se fait à partir des organes touchés à condition que le prélèvement soit réalisé sur des sujets fraîchement morts, pour la simple

raison que, *E.coli* diffuse rapidement à travers la paroi intestinale. L'identification de l'espèce bactérienne se fait par différentes techniques incluant les techniques automatisées [13].

L'identification antigénique, ou la recherche des facteurs de virulence sont de bons moyens de diagnostic des APEC particulièrement lors d'études épidémiologiques [27].

L'identification antigénique vise à définir les souches en fonction de leurs antigènes de surface. Les souches prélevées présentent généralement les antigènes somatiques des groupes O1, O2 et O78 dans 15 à 60% des cas. Cependant, le sérotypage du reste des souches, toutes aussi pathogènes, pose souvent problème en raison de sa difficulté [3]. Des microorganismes autres qu'*E.coli* peuvent causer des lésions similaires, exemple : Des lésions de perihépatite et de péricardite peuvent être engendrés par d'autres microorganismes comme les *Pasteurella* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp. ; *Mycoplasma* et *Chlamydophila* peuvent aussi causer de l'aerosacculite.

2.6. Traitement

L'antibiothérapie reste le principal moyen de lutte contre la colibacillose, les antibiotiques les plus souvent employés sont les β-lactamines, les tétracyclines, les fluoroquinolones, et la colistine. Malheureusement l'utilisation non raisonnée des antibiotiques a conduit à l'émergence de résistance [3]

L'apparition de résistance a conduit au développement et à la recherche de traitements alternatifs comme les probiotiques, les prébiotiques, les acidifiants, les immuno-potentialisateurs, les anti-inflammatoires et les vitamines tel l'acide ascorbique [22].

L'administration de bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* F1 protège les poussins contre l'infection par APEC. Des souches de *Bacillus* spp. et de *Bifidobacterium* augmentent la résistance à la colibacillose et peuvent être utilisés comme probiotiques [30].

2.7. Prévention

Le contrôle des facteurs environnementaux permettra de limiter la survenue de la maladie, en effet, La contamination à partir des matières fécales est la principale

source des *E.coli* pathogènes. De ce fait, le ramassage fréquent des œufs et l'élimination de ceux qui sont souillés, la fumigation, la désinfection du matériel, incubateurs et éclosoirs, permet de minimiser les mortalités embryonnaires. La qualité de l'eau joue également un rôle important dans le contrôle de la maladie [22].

Une variété de vaccins, ont été développés, ils incluent :

- Des vaccins inactivés : certains sont préparés à partir de sérotypes pathogènes mais avec l'inconvénient de l'absence d'immunité croisée avec les autres sérotypes. Une inactivation par ultrasons suivie d'irradiation est aussi utilisée [71].
- Des vaccins vivants utilisent des souches non pathogènes avec une endotoxine incomplète [72].
- Des vaccins mutants faits à partir de souches mutantes présentant une délétion dans un des gènes nécessaire à la production d'arginine et de pyrimidines [73].
- Des vaccins recombinés avec une souche de *Salmonella typhimurium* pour produire des déterminants homologues du groupe B et l'antigène O78 d'*E. coli* [74].

L'Immunisation passive : permet d'éliminer les bactéries du sang et résulte d'une augmentation de la résistance au challenge par aérosol. Des sérum et des anticorps sont utilisés, ils entraînent une bonne protection contre les APEC [75].

L'immuno-potentialisation permet d'augmenter l'immunogénérité des vaccins recombinants par exemple : les motifs GpC (cytosine phosphodiester guanine) sont présents en grand nombre dans l'ADN bactérien et augmentent la réponse immunitaire innée. Des oligonucléotides contenant ces motifs peuvent être rajouté dans les vaccins, ce qui améliore l'immunogénérité [76].

CHAPITRE 3

3 LES ANTIBIOTIQUES ET L'ANTIBIORESISTANCE

3.1. Les antibiotiques

La notion d'antagonisme microbien est découverte pour la première fois par Pasteur et Joubert suite à leurs travaux sur le bacille du charbon en 1877. Vuillemin donne à ce phénomène le nom d' « antibiose » qui vient du Grec (« anti » qui veut dire contre, et « biose » qui veut dire la vie), pour désigner « contre la vie » [77].

En 1928, cette notion va se confirmer lorsque Fleming contamine accidentellement ses boîtes de Staphylocoques par des souches de champignons : *Penicillium notatum*. Mais ce n'est que 10 ans plus tard que la substance chimique (sel sodique de pénicilline) fut isolée et purifiée par Chain et Flory. Après plusieurs essais cliniques qui permettront de vérifier l'innocuité de la pénicilline, celle-ci est finalement produite par la société américaine Pfizer dès 1943 [78].

L'antibiotique est défini comme une substance produite par des microorganismes procaryotes (bactéries) et eucaryotes (champignons) et doués d'une activité antibactérienne en milieu organique [77]. Les antibiotiques peuvent avoir une origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique, ils peuvent avoir une activité bactéricide ou bactériostatique [79].

3.2. Utilisation des antimicrobiens en production aviaire

Le but de l'utilisation des antibiotiques est de limiter les pertes économiques et les mortalités dues aux maladies. Il existe 3 types d'utilisation d'antibiotiques dans le secteur avicole :

- Utilisation thérapeutique

L'usage curatif consiste à traiter les animaux malades à titre individuel. Toutefois, en élevage avicole, l'utilisation thérapeutique est de type métaphylactique, car le traitement est basé sur l'application des antibiotiques sur l'ensemble des sujets

constituant l'élevage, aussi bien malades ou sains. L'objectif étant de diminuer la mortalité due à l'infection et d'obtenir la guérison des sujets infectés. Ce type d'utilisation a comme principal inconvénient, la non maîtrise des doses thérapeutiques individuelles et de ce fait, contribue à l'émergence de résistance [80].

- Utilisation prophylactique

Les antibiotiques sont aussi utilisés afin de prévenir la survenue de maladies dans les élevages avicoles. Les antibiotiques sont utilisés à titre préventif, lorsque la probabilité d'apparition de l'infection est importante par la présence seule d'un facteur de risque, favorisant la survenue de la maladie infectieuse [81]. La prévention est notamment appliquée durant les épisodes de stress liés au transport ou aux vaccinations. L'antibioprophylaxie est une des causes majeures d'apparition de résistance [80].

- Promoteur de croissance

L'effet des antimicrobiens à des doses sous-thérapeutiques sur la croissance des volailles et notamment le gain de poids et la diminution de la consommation des aliments, a été découverte dans les années 40 [82]. Plusieurs antimicrobiens ont été utilisés comme facteur de croissance, en particulier les pénicillines et la tétracycline, ces derniers sont incorporés dans l'alimentation, ils seraient capables d'interagir avec la flore microbienne [83].

Cette utilisation est devenue, par la suite, une source de controverse en raison des résistances bactériennes qu'elle engendre, pour être finalement bannie par tous les pays européens en 2006 [81],[82].

3.3. Impact des stratégies thérapeutiques sur la résistance bactérienne

Il est certain que les antibiotiques ont révolutionné la médecine depuis leur découverte, ils sont aussi bien utilisés en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire, et il n'existe pas de molécules spécialement dédiées à la médecine vétérinaire. Les molécules sont partagées par les deux secteurs et appartiennent aux mêmes familles. Cependant, leur utilisation a conduit à l'augmentation de résistance au niveau de la flore pathogène et de la flore commensale et la dissémination de bactéries résistantes dans l'environnement [81].

Par ailleurs, la flore commensale constitue un réservoir de bactéries résistantes et de gènes de résistance, ces derniers peuvent être transmis de l'animal à l'homme et vice versa via l'alimentation ou par simple contact. Le flux de cette transmission est encore non quantifié [84].

La résistance aux antimicrobiens est définie comme la capacité des bactéries à survivre et/ou à se développer en présence d'un produit chimique (médicament) qui devrait normalement les tuer ou inhiber leur croissance [85]. La résistance peut être naturelle liée à la présence d'un gène chromosomique de la bactérie, ou acquise suite à une mutation ou par acquisition d'éléments génétiques mobiles par transfert horizontal [86].

3.4. Transfert de résistance

La résistance aux antibiotiques peut se transmettre aux générations futures par multiplication (transfert vertical). Le transfert horizontal fait que la résistance aux antibiotiques n'est pas un phénomène inhérent à une seule espèce bactérienne, il nécessite la présence d'éléments génétiques capables d'autoréplication [85] ; en effet, les bactéries sont douées d'une flexibilité génétique leur procurant une capacité d'adaptation à de nombreux biotopes, et les gènes acquis par transfert horizontal peuvent diffuser dans l'environnement et parmi les populations bactériennes par plusieurs mécanismes, dont la conjugaison, la transformation et la transduction [87].

3.5. Supports génétiques de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est due à l'acquisition de gènes de résistance portés par 3 sortes d'éléments génétiques mobiles qui sont : les plasmides, les transposons et les intégrons. Ces éléments sont à l'origine de la diffusion de résistances entre des bactéries de différentes espèces par conjugaison, transformation, ou transduction.

3.6. Les principaux antibiotiques et leurs mécanismes de résistance

Les agents antimicrobiens peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action en différents groupes tels que : les antimicrobiens ciblant la synthèse de la paroi bactérienne (β -lactamines) ; inhibant la synthèse des acides nucléiques (quinolones et fluoroquinolones), agissant sur les acides nucléiques (sulfonamides

et triméthoprime), inhibant la synthèse des protéines (aminoglycosides, phénicolés, macrolides et tétracyclines) et agissant sur les membranes (polymexines) [80].

3.6.1. Les β-lactamines

Les β-lactamines constituent un vaste groupe d'antimicrobiens, ce sont des produits idéaux pour la médecine humaine et vétérinaire en raison de leur large spectre d'action, leur faible toxicité et aussi de la disponibilité d'un large choix de molécules effectives [88]. Ils ont une structure commune caractérisée par la présence d'un cycle β-lactame [89].

Les β-lactamines sont produites par fermentation ou par hemi-synthèse, 4 familles sont distinguées, les pénicillines, les céphalosporines, et les carbapénèmes et les monobactames, différentes par la nature de leurs chaînes latérales, ce qui expliquerait leur affinité de liaison, leur spectre d'activité et leur propriétés pharmacocinétiques. A ces familles, s'ajoute, les inhibiteurs des β-lactamases, ils ont une activité antibactérienne mais sont surtout utilisés associée à une autre β-lactamine en présence de bactéries productrices de β-lactamases de la classe A d'Ambler [90].

3.6.1.1 Mode d'action

L'action des β-lactamines, se situe sur la synthèse de la paroi bactérienne. Pour la majorité des bactéries, la synthèse de la paroi cellulaire et plus précisément du peptidoglycane nécessite des enzymes transpeptidases nommées « protéines de liaison à la pénicilline : PLP », il en existe une trentaine, dont le rôle est la polymérisation des acides aminés précurseurs du peptidoglycane. Ces enzymes sont ancrées dans la membrane cytoplasmique et émergent par leur extrémité NH₂ dans le périplasme [86].

Les β-lactamines étant des analogues de l'extrémité D-Ala D-Ala terminale du peptidoglycane, ils se fixent sur le site cible de l'enzyme, provoquant une ouverture du cycle β-lactame, avec formation d'une liaison covalente et irréversible à l'enzyme [78]. L'arrêt de la synthèse du peptidoglycane est obtenu par inactivation de l'enzyme, ce qui est appelé « inhibition-suicide », ce mécanisme entraîne l'arrêt de la croissance bactérienne et l'apparition de

bactéries amorphes (filamenteuses, ovoïdes) et des sphéroblastes, qui vont éclater par lyse osmotique. L'effet bactéricide n'est pas obtenu par lyse bactérienne, mais par un processus d'autolyse initié par la bactérie [86].

La membrane des bactéries à Gram négatif agit comme une barrière hydrophobe, ne laissant pas passer les β -lactamines, qui sont des molécules hydrophiles ; pour qu'ils puissent traverser la membrane externe, des porines sont répartis le long de la paroi, organisés en trimères permettant le passage de l'antibiotique. Pour les bactéries à Gram positif, le passage est possible, par absence de membrane externe [78],[91].

3.6.1.2 Mécanisme de résistance

Les mécanismes de résistance acquise aux β -lactamines sont de type enzymatique et non enzymatique. Ils concernent toutes les étapes de diffusion, de la pénétration de l'antibiotique, jusqu'à l'atteinte de la cible à savoir les PLP.

3.6.1.2.1 Inactivation non enzymatique

3.6.1.2.1.1 Diminution de la perméabilité

Ce mécanisme concerne principalement les bactéries à Gram négatif, dont la paroi constituée de peptidoglycane empêche le passage des β -lactamines, qui se fait, alors, par les porines. De ce fait, la diminution du nombre de porine, qui est le cas le plus fréquent, ou un changement de leur conformation, aura comme conséquence, une diminution de la concentration de l'antibiotique au niveau périplasmique et empêchera l'accès de l'antibiotique à sa cible [92]. Chez *E. coli*, 2 porines essentielles sont retrouvées OmpF et OmpC, l'OmpF étant plus large et plus importante, des mutations à leur niveau sont automatiquement suivis par une augmentation considérable de la CMI [91].

3.6.1.2.1.2 Modification des PLP

Ce mécanisme est plus fréquemment rencontré chez les bactéries à Gram positif, il est dû à des mutations chromosomiques ou à une acquisition de gènes de résistance, ayant pour conséquence une modification dans la conformation des PLP, ce qui induit une diminution de l'affinité pour l'antibiotique [78].

3.6.1.2.1.3 Système d'efflux

Ces systèmes existent aussi bien chez les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Cependant, les pompes à efflux responsables des résistances acquises aux β -lactamines, ne sont retrouvées que chez les Gram négatifs. Des mutations dans les gènes répresseurs des transporteurs membranaires sont à l'origine d'une surexpression des pompes d'efflux. Ils permettent d'expulser les antibiotiques par un mécanisme actif, agissant même contre le gradient de concentration [93].

Chez *E.coli*, La mutation du répresseur *marA*, aura comme conséquence, non seulement, une surexpression de la pompe à efflux *acrAB*, mais aussi une diminution de la production de la porine *ompF*, conférant une multirésistance des bactéries [91].

3.6.1.2.2 Inactivation enzymatique

Le mécanisme le plus important de la résistance des bactéries à Gram négatif comme *E. coli* aux β -lactamines est bien l'inactivation enzymatique de l'antibiotique par la production de β -lactamases (BL).

Les β -lactamases constituent un groupe hétérogène d'enzymes codées par des gènes plasmidiques ou chromosomiques [90],[92]. L'identification du rôle de la β -lactamase dans le mécanisme d'inactivation de la pénicilline a été rapportée pour la première fois en 1940, par Abraham et Chain [94], ce qui a constitué une préoccupation pour l'utilisation continue des antimicrobiens β -lactamines [95]. Ces enzymes sont des protéines à sérine active qui se lient de manière plus efficace aux β -lactamines que les PLP qui vont être capables d'hydrolyser et d'inactiver le cycle β -lactame.

Le mécanisme d'action des β -lactamases repose sur la liaison non covalente de l'enzyme à son substrat, s'ensuit une hydrolyse de la liaison amide, qui entraîne la formation d'un acyl-enzyme, ce dernier sera par la suite dégradé en acide inactif. Chez les gram négatifs, ces enzymes sont stockées dans l'espace périplasmique, mais chez les Gram positifs elles sont directement excrétées [92].

3.6.1.2.2.1 Classification des β-lactamases

Deux classifications ont été proposées pour les bétalactamases, la première est la classification moléculaire d'Ambler [96], la deuxième, plus récente, la classification fonctionnelle de Bush Jacoby [97].

La classification d'Ambler est basée sur la structure primaire de l'enzyme, en d'autres termes, la structure du gène codant la β-lactamase ou la séquence peptidique du site actif de l'enzyme. Quatre classes sont proposées : les classe A, C et D sont des enzymes à sérine active ; et la classe B ou métalloβ-lactamases, ces dernières nécessitent la présence d'ion métalliques pour leur activité, de ce fait, elles peuvent être inactivées par des agents chélateurs [91].

La classification de Bush repose sur l'affinité pour les substrats, et le profil d'inhibition des enzymes, il en existe 4 groupes répartis en plusieurs sous-groupes. Cette classification représente le spectre d'activité de l'enzyme. En dépit de la différence sur leur principe, néanmoins, ces deux classifications peuvent se superposer.

3.6.1.2.2.2 Les β-lactamases exprimées chez *E.coli*

Jusqu'à présent, on a identifié plus de 600 variants de BLSE dans le monde [97],[98]. Cependant, de nouvelles β-lactamases continuent à apparaître à travers le monde, mettant en danger la santé publique [89].

3.6.1.2.2.2.1 Les BL chromosomiques

Les espèces bactériennes *E.coli* et *Shigella* spp., sont les seules à exprimer les enzymes chromosomiques constitutives type AmpC [91].

Ces enzymes sont classées parmi le groupe 1 de Bush (classe C d'Ambler), elles sont exprimées à un niveau très bas, elles ne sont pas inducibles et sont produites à des niveaux si faibles qu'elles n'apportent pas de contribution significative à la résistance aux β-lactamines dans ces espèces. En conséquence, ces souches restent sensibles aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première génération [91]. Toutefois, des mutations au niveau de promoteur fort, peuvent survenir, rendant ces bactéries, résistantes à l'amoxicilline et la céfaloïne, avec une diminution de l'efficacité des céphalosporines de 2eme et

3eme génération, cependant elles restent sensibles à l'imipénème, elles sont dites à céphalosporinases hyperproduites [99].

3.6.1.2.2.2 Les BLSE

Les enzymes chromosomiques ne sont pas les seules exprimées par *E.coli*, des enzymes d'origine plasmidiques contribuent de façon plus importantes à la résistance aux β-lactamines [92].

En effet, la résistance aux pénicillines à large spectre est généralement conférée par des β-lactamases codées par des plasmides, principalement de type TEM et, dans une moindre mesure, de type SHV. Aujourd'hui, les enzymes CTX-M (en particulier CTX-M-15) sont devenues aussi répandu [88].

Toute mutation unique ou multiple des enzymes TEM ou SHV étend leur capacité hydrolytique aux β-lactamines et céphalosporines de troisième et quatrième génération ; ces enzymes sont appelées β-lactamases à spectre étendu (BLSE). Actuellement, plus de 600 BLSE différentes ont été décrites [97],[98].

Les BLSE, à l'exception des BLSE de type OXA de classe D, sont classées dans la catégorie A selon la classification d'Ambler, et dans la classe 2be selon la classification de Bush-Jacoby Madeiros. Ces catégories regroupent les enzymes capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème et 4ème génération, ainsi que l'aztréonam. En laboratoire, elles sont inhibées par les inhibiteurs des bêta-lactamases tels que l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam. De plus, elles présentent une sensibilité aux céphamycines, telles que le céfotétane et la céfoxidine, ainsi qu'aux carbapénèmes [92].

La distribution mondiale de ces enzymes parmi les bactéries Gram-négatives a été liée aux éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, et a été associée à la dissémination de la MDR [90].

- **Les BLSE de type TEM**

Les B-lactamases de type TEM, sont les plus fréquentes chez les bactéries à Gram négatif [90]. TEM-1 a été isolée pour la première fois en Grèce en 1965 chez *E.coli* isolée d'une patiente qui se prénomme Temoneira, d'où son nom [92]. TEM-1, TEM-2 et TEM-13, ne sont pas considérés comme des BLSE, car ils présentent une faible activité envers les dérivés de la pénicilline. TEM-3 est la

première BLSE de type TEM décrite, elle a été isolée pour la première fois en 1988, chez *Klebsiella pneumoniae*, en France [98].

Des mutations ponctuelles peuvent survenir chez les TEM-1 et TEM-2, par substitution d'un seul acide aminé, ce qui est à l'origine de l'apparition des dérivés des TEM d'origine [98]. Actuellement il existe plus de 150 dérivés, dont une centaine, ont un phénotype BLSE. Parallèlement, certaines enzymes de type TEM, ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution d'affinité aux inhibiteurs des β -lactamases, ce sont les TRI (TEM Résistantes aux Inhibiteurs), qui présentent également, une résistance aux céphalosporines de troisième génération [91].

Le gène codant pour TEM (*blaTEM*) est localisé plus souvent sur des transposons, ces derniers sont caractérisés par une grande mobilité d'où le fait que TEM-1 est isolé fréquemment [88],[100].

- **Les BLSE de type SHV**

La dénomination SHV fait référence au Sulfhydryl variable. La plupart des BLSE de type SHV, sont des dérivés de SHV-1 [98]. SHV-1 est une pénicillinase, tandis que le SHV-2, identifié pour la première fois en 1983 chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne, est une céfotaximase [91]. Chez *E.coli*, le gène *blaSHV* codant l'enzyme SHV est localisé sur un plasmide. Ce gène contient habituellement une séquence d'insertion (IS 26) facilitant le processus de transfert [88].

Enfin, le variant SHV-12 (le plus fréquent parmi les enzymes SHV) a été observé en association avec le gène responsable de la résistance aux quinolones QnrB, porté par un plasmide [101].

- **Les BLSE DE TYPE CTX-M**

Ces enzymes ont d'abord été décrites en 1986 au japon, suite à une résistance d'*E.coli* à un traitement par la céfotaxime, à ce moment elle fut nommée FEC-1 [92]. En 1989, une résistance similaire a été décrite à Munich en Allemagne, elle a été baptisée CTX-M-1. Ce sont des enzymes de classe A à sérine active, qui confèrent une résistance élevée à la céfotaxime (CMI > 64 $\mu\text{g/ml}$), mais faible à la ceftazidime (CMI de 2 à 8 $\mu\text{g/ml}$) [102].

Actuellement, CTX-M15 représente la céfotaximase de type CTX-M, la plus probable, isolée lors d'une résistance d'*E.coli* à la céfotaxime, principalement chez les espèces animales [103],[104].

3.6.1.2.2.2.3 Les céphalosporinases plasmidiques AmpC

Au cours des dernières années, des β -lactamases AmpC plasmidiques et non inductibles telles que CMY, FOX, MIR, MOX, ACT-1 retrouvés chez quelques genres bactériens appartenant aux *Enterobacteriaceae* et notamment chez *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, mais aussi *P. mirabilis* ou *Salmonella* spp.. Le phénotype de résistance associé est similaire à celui des céphalosporinases hyperproduites, avec résistance aux pénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3eme génération, aux monobactames et céphamycines, et elles sont résistantes à l'hydrolyse par les inhibiteurs des β -lactamases avec une sensibilité conservée aux carbapénèmes et plus ou moins aux céphalosporines zwittérioniques comme le cefépime et le cefpirome [105].

3.6.1.2.2.2.4 Carbapénémases

Il s'agit d'un groupe d'enzymes regroupant les oxacillinases et les métallo β -lactamases :

- **Oxacillinases :**

Les oxacillinases appartiennent à la classe D de la classification d'Ambler et 2d de la classification de Bush [98].

la BLSE de type OXA la plus anciennement décrite est OXA-1, elle fréquemment isolée chez *E.coli*, elle confère une résistance aux pénicillines avec une activité moyenne sur les céphalosporines de première et deuxième génération, par contre l'activité des céphalosporines de troisième génération et l'Aztréonam est conservée, elles seraient aussi insensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique [91].

Parmi les oxacillinases, certaines ont acquis une résistance aux carbapénèmes. Chez *E.coli*, la carbapénémase de type OXA la plus récemment isolée est OXA-48 [88].

- **Metallo β -lactamases :**

Ces enzymes appartiennent à la classe B d'Ambler, caractérisées par la présence d'un ion zinc dans leurs sites actifs. Elle entraîne une résistance à toutes les β -lactamines, y compris les carbapénèmes, seul l'aztreonam est épargné. Elles sont résistantes à l'hydrolyse par l'acide clavulanique mais elles sont hydrolysées par l'EDTA. Ce sont des enzymes portées par des éléments génétiques mobiles, mais aussi parfois par des chromosomes, d'ailleurs les carbapénémases d'origine chromosomiques sont connues depuis les années 60 notamment chez *Bacillus cereus* [91].

L'utilisation croissante des carbapénèmes, en réponse à l'émergence des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), a conduit à l'apparition des carbapénémases. Depuis, une vingtaine d'enzymes de ce type ont été répertoriées. La première carbapénémase identifiée fut IMP-1 au Japon en 1991, chez *S. marcescens*. Depuis lors, l'enzyme IMP-1 s'est répandue de manière significative parmi diverses espèces bactériennes, notamment les entérobactéries. Cette découverte a été rapidement suivie par l'émergence d'enzymes analogues telles que, IMP-2, VIM-1 et VIM-2 [106].

Cependant, la carbapénémase de type métallo β -lactamase la plus récemment identifiée chez *E.coli*, est NDM acronyme de New Delhi métallo β -lactamase. NDM-1 a été identifiée pour la première fois en 2008 en Suède chez un patient en provenance d'Inde, puis, elle s'est propagée dans tous les continents, avec apparition de nombreux variants notamment NDM-4 chez *E.coli*. Aujourd'hui les enzymes NDM sont les plus fréquemment rencontrés [91].

3.6.1.2.2.2.5 D'autres BLSE :

Deux enzymes appartenant au sous-groupe 2f et qui sont des ceftazidimases. L'enzyme VEB-1 (Vietnamese extended-spectrum β -lactamase) est très souvent isolée en Thaïlande et au Vietnam chez les entérobactéries, elle a été identifiée pour la première fois chez *E.coli* en 1996 au Vietnam. Cette enzyme confère une résistance aux céphalosporines et à la ceftazidime. Une autre enzyme nommée GES-1 est également une BLSE parfois isolée chez les entérobactéries, elle est capable de conférer une résistance aux céphalosporines, particulièrement la ceftazidime mais n'hydrolyse pas l'Aztreonam, plusieurs variants de GES-1 existent notamment GES-2, celle-ci, a élargi son spectre d'activité aux

carbapénèmes, avec une activité variable des inhibiteurs des β -lactamases, les céphalosporines de troisième génération sont partiellement hydrolysées [98].

3.6.2. Les tétracyclines

La tétracycline a été le premier antibiotique à large spectre capable d'inhiber les bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que les protozoaires. Les tétracyclines constituent l'une des plus anciennes classes d'antibiotiques, l'utilisation clinique de ce médicament ayant été introduite en 1952 [107].

Actuellement, en raison de leur disponibilité, de leur faible coût, de leur faible toxicité et de leur large spectre d'activité, ils sont l'un des agents thérapeutiques les plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Chez le poulet de chair, les molécules de cette famille (oxytétracycline, chlortétracycline et doxycycline) sont utilisées aussi bien en thérapeutique, qu'en prophylaxie, et même comme facteurs de croissance avant leur interdiction en 2006 [107].

3.6.2.1 Mode d'action

Les tétracyclines inhibent la croissance cellulaire en bloquant la synthèse des protéines [78]. Les tétracyclines arrêtent normalement l'elongation des protéines de synthèse en empêchant la liaison stable de l'aminoacyl ARNt au site A de la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Par conséquent pour parvenir à leurs cibles, les tétracycline doivent franchir les systèmes membranaires des bactéries différemment selon que la bactérie est Gram positive ou négative [78].

3.6.2.2 Résistance :

La résistance à la tétracycline est généralement médiée par l'acquisition de gènes de résistance qui confèrent une résistance par l'un des trois mécanismes principaux : Efflux dépendant de l'ATP, inactivation enzymatique de la tétracycline ou protection des ribosomes bactériens. Un quatrième mécanisme; est la diminution de l'affinité de la tétracycline au ribosome suite à une mutation de l'ARNr 16S [107].

3.6.2.2.1 Pompes à efflux

Les protéines d'efflux sont parmi les mieux étudiées des protéines Tet. Les gènes codant pour ces protéines appartiennent à la superfamille des facilitateurs majeurs

(MFS) [108]. Tous les gènes d'efflux *tet* codent pour des protéines membranaires qui exportent la tétracycline hors de la cellule en échange d'un proton H⁺ d'où le nom « antiporteur » qui est souvent utilisé pour décrire ces protéines. L'exportation de la tétracycline réduit sa concentration intracellulaire et protège ainsi les ribosomes dans la cellule. Environ 30 protéines d'efflux ont été recensées, classées en sept groupes différents en fonction de leur séquence d'acides aminés [109].

3.6.2.2 Protéines de protection ribosomique (PPR)

Les protéines de protection ribosomale ont été décrites initialement chez *Campylobacter jejuni* et *Streptococcus* spp. Les protéines Tet(M) et Tet(O) et OtrA sont des GTPases, elles hydrolysent le GTP pour produire de l'énergie. Elles présentent une grande similarité de séquence et de structure avec les facteurs d'elongation EF-G et EF-Tu. Le mécanisme de protection des ribosomes fonctionne *in vivo* et *in vitro*, contrairement à l'action des protéines d'efflux, qui nécessitent des membranes intactes pour fonctionner [110].

Les PPR des tétracyclines les plus couramment retrouvés et caractérisées sont Tet(O) et Tet(M) [111]. Ce sont des protéines GTP dépendantes, qui catalysent la libération de la tétracycline du ribosome [78]. Les PPR rentrent en compétition avec EF-G car ils présentent des sites de liaison ribosomiaux chevauchants ; lorsque la tétracycline se lie au ribosome, les PPR interviennent pour dissocier la tétracycline de son site de liaison en interférant directement par une liaison à l'hélice H34 de l'ARNr 16S provoquant un changement de conformation du site de liaison, réduisant, par cet effet, son affinité pour cet antibiotique. Les changements de conformation induits par les PPR favorisent une liaison rapide de l'EF-Tu [109].

Les PPR confèrent une résistance à large spectre pour les tétracyclines, minocycline et doxycycline [110].

3.6.2.3 Inactivation enzymatique

Les enzymes modifiant la tétracycline ont été d'abord décrit comme une activité codée par un plasmide porté par *Bacteroides* et exprimé chez *E. coli*, cette activité est codée par les gènes de type tet(X), et qui permet l'hydroxylation irréversible de la tétracycline [109].

Le gène *tet(X)* a été découvert parce qu'il est lié à *erm(F)*, qui code pour un gène de méthylase de l'ARNr. Le gène *erm(F)* a été cloné dans *E. coli*, et les clones se sont avérés conférer une résistance à la tétracycline lorsque celui-ci est cultivé en aérobiose [111].

3.6.2.2.4 Mutation des sites d'attachement

Des mutations de l'ARNr ont été rapportés chez des bactéries dont le nombre de copies du gène de l'ARNr est faible, comme *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium bovis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Helicobacter pylori*. Les mutations ciblées de l'ARNr 16S confèrent une résistance à la tétracycline [109].

3.6.3. Aminosides

Le premier antibiotique découvert dans cette famille est la streptomycine isolé en 1944 à partir des actinomycètes du genre *Streptomyces*, il représente le premier traitement contre la tuberculose. Les premières molécules de cette famille sont synthétisées naturellement, plus tard des molécules semi-synthétiques sont produites pour pallier aux résistances apparues aux molécules naturelles [78].

Les aminosides sont des antibiotiques à large spectre, bactéricides, plus fréquemment utilisables pour traiter les infections bactériennes à Gram négatif. Il s'agit d'un groupe de médicaments caractérisés par l'existence d'un cycle aminocyclitol lié à des sucres aminés dans leur structure [112].

3.6.3.1 Mode d'action :

La première étape à franchir est celle de la paroi bactérienne, en premier lieu, il y a passage à travers des porines pour le franchissement de la membrane externe ; ensuite, pour la membrane interne le passage transmembranaire s'effectue par un mécanisme actif nécessitant de l'oxygène, excluant, de ce fait, les bactéries anaérobies du spectre d'activité des aminosides, parallèlement, l'association des β -lactamines, faciliteraient le passage des aminosides [78].

Dans le cytoplasme, l'effet bactéricide de cette classe est basé sur la liaison irréversible au site aminoacyl de la protéine ARNr 16S dans les sous-unités ribosomiques 30S des bactéries, ce qui entraîne une transcription incorrecte et une mauvaise traduction de la protéine codante, avec pour conséquence la

formation de protéines erronés. La mort cellulaire s'ensuit suite à la saturation des ribosomes et de l'absence de synthèse protéique [112].

3.6.3.2 Mécanisme de résistance

3.6.3.2.1 Diminution de la concentration intracellulaire des aminosides

La modification la plus courante du LPS entraînant une réduction de l'absorption des aminosides est l'incorporation du sucre 4-amino-4-désoxy-L-arabinose chargé positivement, qui réduit effectivement la charge négative nette de la couche de LPS ce qui diminue l'affinité pour les aminosides [113].

En raison des structures polycationiques des aminosides, seules quelques pompes d'efflux ont été mises au point pour éliminer les aminosides. La principale pompe d'efflux des aminosides chez les bactéries Gram-négatives, AcrAD, est un transporteur de médicaments multiples et un membre de la famille des pompes d'efflux RND [93].

3.6.3.2.2 Modification de la cible

Les aminosides ciblent la sous unité 30S du ribosome bactérien. Pour échapper à l'inhibition, des mutations du ribosome ou des modifications enzymatiques sont acquises.

La résistance à l'aminoside peut provenir de mutations dans le gène *rrs*, qui code pour l'ARNr 16S, qui empêchent la fixation de l'antibiotique. Ces mutations, ne sont toutefois pas très courantes, car les modifications de cette machinerie cellulaire vitale sont souvent létales [113].

Outre les mutations, le site de liaison de l'aminoside peut être modifié enzymatiquement par des méthyltransférases de l'ARN ribosomique 16S (RMTases, également appelées communément méthylases de l'ARNr 16S dans la littérature). Les RMTases sont naturellement présentes chez les actinomycètes, le groupe bactérien à partir duquel les aminosides ont été isolés à l'origine. Pour protéger leurs ribosomes de l'inhibition par les aminosides qu'ils produisent, les actinomycètes produisent des RMTases pour méthyler leur propre ARNr [114].

3.6.3.2.3 Modification enzymatique de l'antibiotique

La modification enzymatique et inactivation des aminosides est le mécanisme le plus répandu de résistance des bactéries aux aminosides, il se fait par des acétyltransférases (AAC), nucléotidyltransférases (ANT) ou phosphotransférases (APH). Chaque enzyme modifie un aminoside à une position spécifique, et cette information est incluse dans le nom de l'enzyme [112].

3.6.4. Les quinolones

Les quinolones constituent une classe d'antimicrobiens synthétiques largement utilisée. Le premier membre de la classe, l'acide nalidixique, a été identifié comme un sous-produit de la synthèse de la chloroquine, un antipaludique, en 1962 et son utilisation clinique a été limité parce qu'il n'était destiné que pour le traitement des infections des voies urinaires et en raison de l'émergence précoce des résistances [115].

Des modifications chimiques de la quinolone de base, en ajoutant des substituants aux positions 1, 5, 7 et 8 ont généré des composés plus puissants, des spectres d'activité plus larges, une pharmacocinétique améliorée et une fréquence plus faible de développement de la résistance [78].

Une modification clé par un substitut de fluor en position 6, a conduit au développement de nombreux membres de ce qui est devenu la classe des fluoroquinolones [116]. En raison de leur puissance, de leur spectre d'activité, de leur biodisponibilité orale et de leur profil de sécurité généralement satisfaisant, les fluoroquinolones ont été largement utilisées pour de multiples indications cliniques dans le monde entier aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, avec pour inévitable conséquence l'apparition de résistances bactériennes [115].

3.6.4.1 Mode d'action

Les quinolones passent très bien la paroi des bactéries Gram négatif grâce aux porines largement distribuée dans la membrane externe. Les quinolones inhibent la croissance bactérienne en interférant avec la synthèse de l'ADN en se liant au site cible et en formant des complexes entre l'ADN et les topoisomérases de type II, à savoir l'ADN gyrase (cible préférentielle des Gram -) et la topoisomérase IV

(cible principale des Gram+) [117]. Ce site cible est connu sous le nom de région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) [118].

3.6.4.2 Résistance

La résistance aux quinolones est multifactorielle, elle est principalement de type chromosomique, mais des résistances plasmidiques transférables sont également apparues. Les bactéries peuvent exprimer un seul type ou encore une combinaison de plusieurs mécanismes

3.6.4.2.1 Mécanismes de résistance chromosomique

3.6.4.2.1.1 Imperméabilité de la bactérie :

Les fluoroquinolones, en tant que composés zwitterioniques, sont supposées traverser la membrane externe des bactéries Gram négatives par les porines OmpF et OmpC, et la régulation à la baisse de ces canaux ou la mutation de leurs gènes structurels peut également contribuer à un mécanisme de résistance. Notamment, les mutations de résistance aux quinolones dans le régulateur MarR entraînent à la fois une augmentation de l'expression des pompes à efflux acrB et une diminution de l'expression de l'ompF [115].

3.6.4.2.1.2 Surexpression des pompes à efflux :

Les pompes à efflux qui affectent l'accès aux quinolones chez les bactéries Gram-négatives comprennent les membres des superfamilles RND (résistance-nodulation-division), MFS (facilitateur majeur) et MATE (multidrug and toxic compound extrusion). Les pompes à efflux plurispecifiques de type AcrAB-TolC sont responsables d'expulser les quinolones mais aussi plusieurs molécules d'antibiotiques, leur expression confère le phénotype de multirésistance aux antibiotiques [115][119].

3.6.4.2.1.3 Mutations :

Des modifications d'un seul acide aminé dans la gyrase ou la topoisomérase IV peuvent entraîner une résistance aux quinolones. Ces mutations de résistance ont le plus souvent été localisées dans les domaines de GyrA ou de ParC dans le QRDR [115].

3.6.4.2.2 Mécanismes de résistance plasmidiques

Tous les mécanismes de résistance plasmidiques (PMQR) entraînent de faibles niveaux de résistance, mais leur présence favorise l'apparition de niveaux cliniques de résistance aux fluoroquinolones et la présence de plusieurs mécanismes PMQR peut entraîner des niveaux cliniques de résistance aux fluoroquinolones sans mutations chromosomiques [120].

3.6.4.2.2.1 Protéines Qnr

La résistance aux quinolones médiée par les plasmides code pour des protéines répétées pentapeptidiques qui se lient à l'ADN gyrase et à la topoisomérase IV et les protègent des effets inhibiteurs des quinolones. Le gène *qnrA1* a été découvert en 1998 chez *K.pneumoniae*. Depuis, de nombreux autres gènes de résistance aux quinolones (*qnr*) ont été signalés : *qnrA* ; *qnrB* ; *qnrS* ; *qnrC* et *qnrD* [118].

3.6.4.2.2.2 Les protéines aac(6')lb-cr

Un gène de mécanisme d'inactivation enzymatique de l'antibiotique médié par un plasmide, *aac(6')lb-cr*, qui pourrait contribuer au développement de la résistance aux quinolones, a été identifié en 2006 . Le gène *aac(6')lb-cr* code pour une enzyme aminoglycoside 6'-N-acétyltransférase bifonctionnelle, qui a été associée à la résistance à la kanamycine, ainsi qu'à la ciprofloxaciné chez plusieurs espèces bactériennes, y compris *E. coli* [118].

3.6.4.2.2.3 Les pompes à efflux plasmidiques

Les gènes du site PMQR, *oqxAB* et *qepA*, codent pour des pompes d'efflux et entraînent une résistance [118]. *qepA* code pour une pompe à efflux de la famille des MFS, elle a souvent été trouvé sur des plasmides codant également une enzyme, la méthylase ribosomale *rmtB* impliquée dans la résistance aux aminosides [121], quant à *oqxAB* (une pompe à efflux de la famille des RND) a été isolée plus fréquemment chez des *E. coli* provenant de porcs [118].

3.6.5. Les sulfamides-triméthoprime

La découverte des sulfamides, qui représente la première classe d'antimicrobiens, a eu lieu en Allemagne en 1932 par Gerhard Domagk et l'utilisation de cet antimicrobien dans la pratique médicale a suivi trois ans plus tard [122]. Le

triméthoprime a été utilisé pour la première fois en 1962. C'est en 1968 que l'association sulfamide-triméthoprime a été enregistrée pour un usage clinique après que leur synergie ait été confirmée. L'utilisation combinée de ces deux médicaments présente un large spectre d'activité contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, ainsi que contre les protozoaires [122],[123]. Il est important de noter que la combinaison de ces deux antibiotiques augmente leur activité car permet de cibler plusieurs étapes critiques du métabolisme bactérien, ce qui réduit le risque de développement de résistance bactérienne par rapport à l'utilisation d'un seul antibiotique [78].

3.6.5.1 Mode d'action

Le mode d'action des sulfamides et du triméthoprime est basé sur l'interférence avec la synthèse de l'acide tétrahydrofolique. La majorité des bactéries ont besoin de folate pour produire des acides nucléiques, car elles n'ont pas la capacité d'absorber le folate de l'environnement, et doivent le synthétiser eux-mêmes. Le mécanisme d'action du triméthoprime et des sulfamides repose sur l'inhibition de la croissance bactérienne en interférant avec les systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse des folates [122],[124]

Les sulfamides agissent en mimant l'acide para-aminobenzoïque (PABA), ils inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS), qui catalyse la formation de dihydrofolate à partir de l'acide para-aminobenzoïque (PABA). Dans l'étape suivante de la voie, le triméthoprime inhibe la dihydrofolate réductase (DHFR), qui catalyse la formation de tétrahydrofolate à partir du dihydrofolate [124]. Cette combinaison d'antibiotiques agit de manière synergique pour inhiber la synthèse des nucléotides, ce qui entraîne la mort des bactéries [86].

3.6.5.2 Résistance

Le sulfaméthoxazole(triméthoprime) (SXT/TMP) est une association d'antibiotiques couramment utilisée pour le traitement de diverses infections bactériennes. Cependant, certaines bactéries peuvent développer une résistance, celle-ci peut se produire par le biais de plusieurs mécanismes, notamment : des pompes d'efflux, modification de la perméabilité membranaire et à des mutations dans les enzymes cibles [122].

3.6.5.2.1 Réduction de la perméabilité et expression des pompes à efflux

La résistance médiée par la diminution de la perméabilité membranaire a été signalée comme agissant à la fois contre les sulfamides et le triméthoprime. En outre, cela est également le cas pour les pompes d'efflux. Ces 2 mécanismes peuvent survenir suite à des mutations, et il peut être difficile de séparer leurs influences sur les niveaux de résistance [124].

3.6.5.2.2 Inactivation enzymatique

Le mécanisme le plus fréquent de résistance bactérienne aux sulfamides est l'acquisition de l'enzyme dihydroptéroate synthétase codée par les gènes *sul1*, *sul2* et *sul3* [125].

Chez *E. coli*, des mutations chromosomiques dans le gène *dhfr* sont également décrites, elles augmentent la concentration d'enzymes de manière considérable et diminuent la sensibilité à la triméthoprime. La production par un plasmide d'une DHFR supplémentaire transférable explique la résistance des entérobactéries à la triméthoprime. Le groupe d'enzymes parmi les plus fréquemment isolés chez les entérobactéries appartient au groupe *dhfrI*, ainsi que des variants des enzymes *dhfrII* [124].

3.6.6. Polymyxines

Les polymyxines sont des antibiotiques polypeptidiques cationiques découverts dans les années 1940. La structure des polymyxines est composée d'un décapeptide cyclique lié à une chaîne d'acides gras [126]. Actuellement, les deux antibiotiques les plus couramment utilisés en clinique sont la polymyxine B et la polymyxine E.

3.6.6.1 Polymyxine E (colistine)

La colistine est un antibiotique polypeptidique isolé en 1947 à partir de la bactérie *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus*. La colistine est l'antibiotique le plus couramment utilisé en médecine vétérinaire. L'utilisation de la colistine en médecine humaine, a été limitée pendant des années, du fait de sa neuro et nephrotoxicité [126]. Récemment, un nouvel intérêt lui a été porté ces dernières années avec l'émergence des bactéries multirésistantes notamment les bactéries Gram négatives (BGN) synthétisant des carbapénémases, faisant de la colistine

un antibiotique de dernier recours pour traiter les infections secondaires à ces bactéries. Certaines bactéries sont naturellement résistantes comme certains genres de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Proteus*, *Providencia*, *Serratia* et *Morganella*), ainsi que *Burkholderia* et *Neisseria* [127].

3.6.6.1.1 Mode d'action

Le rôle du LPS en tant que récepteur principal des polymyxines a été proposé, et il a été démontré que le mode d'action impliquait une interaction hydrophobe entre la chaîne latérale d'acide gras à neuf carbones de la colistine et la portion d'acide gras du lipide A [128].

Le pôle d'acide gras chargé positivement de la colistine présente une affinité aux molécules chargés négativement plus précisément les ions phosphate présent sur le lipide A du LPS, principal constituant de la membrane externe des bactéries Gram négatif. La colistine va agir comme un détergent en déplaçant les ions chargés positivement (Ca++ et Mg++) du LPS [127], à l'origine du déséquilibre hydro-électrolytique qui se traduira par la création de nombreux pores dans la membrane, ceci aura pour conséquence une fuite d'eau et du contenu intracellulaire, la mort de la bactéries s'ensuit [126].

3.6.6.1.2 Résistance

De nombreux mécanismes de résistance à la colistine sont décrits, il s'agit d'un processus complexe, impliquant de nombreux gènes de régulation, probablement lié à l'évolution des bactéries qui ont développé divers mécanismes de défense. Les recherches sur la résistance à la colistine, principalement menées sur les entérobactéries, ont permis d'identifier plusieurs mécanismes chromosomiques. Mais aussi des mécanismes plasmidiques engendrant l'émergence d'une importante résistance à la colistine [129].

3.6.6.1.2.1 Mécanismes d'origine chromosomique

3.6.6.1.2.1.1 Modification de la cible de l'antibiotique

Il a été démontré que les BGN, peuvent acquérir un phénotype de résistance en modifiant la charge du lipide A. En effet, les bactéries activent la synthèse de certains sucres tels que le 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-ara4N) et la phosphoéthanolamine (PEtN), ceux-ci se fixent au groupement phosphate du

LPS, réduisant par conséquence la charge électrique, ceci se traduit par une diminution de l'affinité de la colistine pour sa cible [129],[130].

Les sucres précédemment cités sont synthétisés à partir d'un précurseur UDP-glucose, sous le contrôle d'un opéron connu sous le nom de *pmr* (actuellement *arnBCADTEF*). La régulation de la synthèse de L-Ara4N est attribuée à un système à deux composants connu sous le nom de PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ [128].

Chez *E. coli*, la tyrosine kinase Etk est impliquée dans la phosphorylation de l'UDP-glucose, et la délétion du gène Etk entraîne une résistance aux polymyxines [128].

3.6.6.1.2.1.2 Pompes à efflux

Diverses recherches ont indiqué que l'efflux joue un rôle dans la résistance à la colistine. Un nombre considérable d'espèces présentent des pompes à efflux, tels que les protéines Sap (Sensitive antimicrobial peptides), la pompe KpnEF, ou le complexe AcrAB-TolC. En règle générale, ces pompes activées sont responsables d'une résistance simultanée à plusieurs antibiotiques [130],[131].

3.6.6.1.2.1.3 Formation de capsule

La capsule jouerait un rôle dans la résistance à la polymyxine. Cette résistance a déjà été décrite chez des bactéries naturellement résistantes à la polymyxine, telles que *Neisseria meningitidis* et *Campylobacter jejuni*. Chez *N. meningitidis*, la perte de la capsule seule ou de la capsule et du lipooligosaccharide a multiplié par 10 la sensibilité aux polymyxines [130],[131].

En outre, l'expression de la capsule de *S.pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, ou *E. coli* conduit à une résistance aux polymyxines [129].

3.6.6.1.2.2 Mécanismes d'origine plasmidique

Un nouveau mécanisme de résistance à la colistine a complètement changé la vision de la résistance à la colistine. La résistance à la colistine a toujours été liée à un mécanisme chromosomal, sans possibilité de transfert horizontal. Mais en 2015, le gène *mcr-1* codant pour une transférase PEtN a été détecté par Liu et al., dans des souches d'*E. coli* provenant de porcs et de viande en Chine [132]. Le

gène était porté par un plasmide de type Incl2. L'analyse des acides aminés de *mcr-1* a montré qu'il était étroitement lié à l'EptA présent chez *Paenibacillus sophorae* et *Enhydrobacter aerosaccus*. C'est chez *Paenibacillus* spp. que la polymyxine a été découverte et l'on sait que les bactéries qui peuvent synthétiser un antibiotique sont capables d'y résister simultanément [129],[131].

Bien qu'il ait été détecté et identifié pour la première fois en 2015, un autre rapport du même groupe a annoncé sa présence dans des collections d'*E. coli* résistants à la colistine datant des années 1980. D'autres groupes plasmidiques ont été associés à *mcr-1* comprennent actuellement Incl2, IncHI2, IncHI2, IncHI2A, IncX4 et IncP [131],[133].

3.6.7. Phénicols

Le florfénicol et le chloramphénicol, membres de la famille des phénicols, sont des agents antimicrobiens bactériostatiques à large spectre [134]. Le chloramphénicol, initialement isolé à partir de *Streptomyces venezuelae* sous le nom de chloromycétine, inhibe la croissance bactérienne en perturbant la synthèse des protéines. Son mécanisme d'action implique l'inhibition de l'elongation des protéines en ciblant la peptidyl transférase au niveau du ribosome bactérien [78],[134].

L'utilisation du chloramphénicol est très limitée, en dépit de son large spectre, à cause de son effet délétère sur la moelle osseuse [134].

La résistance au chloramphénicol est d'origine enzymatique par des acétyl-transférases, généralement portée par des plasmides, il peut aussi être largué par des pompes à efflux diminuant par conséquent, sa concentration plasmatique [78].

CHAPITRE 4

4 PARTIE EXPERIMENTALE

4.1. Problématique et objectif de l'étude

En raison du manque de compréhension de la vaste diversité des profils de virulence des souches d'*E. coli* aviaires, il n'existe actuellement aucun vaccin efficace pour combattre la maladie. Par conséquent, le traitement antibiotique basé sur un diagnostic précis et la prophylaxie demeurent les seules méthodes de lutte contre cette maladie, malgré l'augmentation des cas de résistance.

Notre étude vise à évaluer la fréquence de résistance des *E.coli* aux antibiotiques, et à obtenir une meilleure connaissance des facteurs de virulence impliqués dans l'apparition de cette maladie à travers des tests phénotypiques et génotypiques.

4.2. Région et période d'étude

L'étude a été réalisée au niveau de la région centre d'Algérie (Ain defla, Chlef, Alger et Blida), comme présenté dans la figure 4.1.

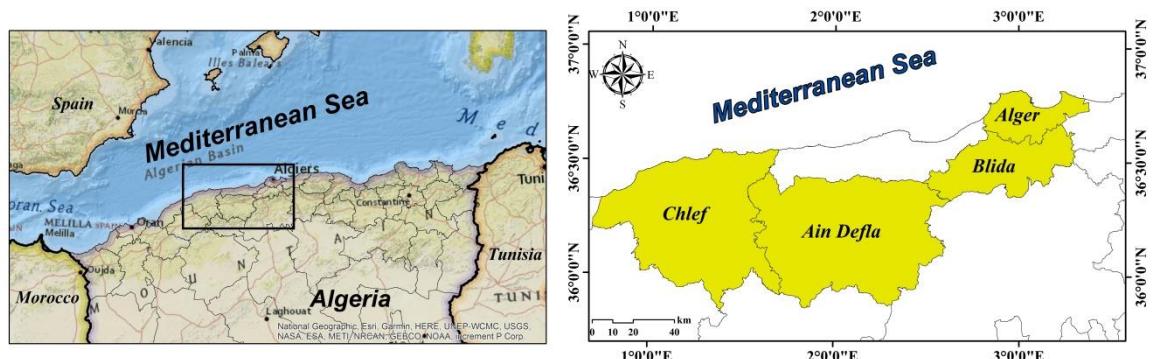


Figure 4.1 : Situation géographique des régions d'étude

Les échantillons ont été collectés avec la participation de vétérinaires praticiens installés dans les régions suscitées, ayant approuvé d'apporter leur aide à la réalisation des prélèvements. La collecte des échantillons s'est étalée sur 2 ans (d'octobre 2019 à octobre 2021), regroupant les filières : chair, ponte, repro-chair et repro-ponte.

4.2.1. Lieu de stage

Les travaux d'isolement, d'identification des souches d'*Escherichia coli* ainsi que les tests phénotypiques ont été effectués au niveau du laboratoire d'analyses médicales de Dr BENDALI Lyes à Miliana. L'étude de la CMI de la colistine et les réactions PCR ont été réalisés au niveau du laboratoire de reproduction animale et le laboratoire de biologie moléculaire du centre de recherche en biotechnologie de Constantine (C.R.B.t).

4.3. Méthodes

4.3.1. Autopsie

Les volailles présentant des signes cliniques de colibacilloses à savoir : diarrhée blanche, abattement, anorexie et retard de croissance, ont été soumis à un examen post-mortem par une autopsie selon les procédures classiques d'autopsie des volailles.

Après examen minutieux de l'aspect extérieur des sujets, on commence l'autopsie en respectant ces étapes. Dans l'ordre, on fait au préalable une incision de la peau, et on note l'aspect des muscles pectoraux, par la suite, on ouvre les cavités thoraciques et abdominales. A cette étape, les organes sont examinés un à un, pour déceler les lésions de nécrose, de fibrine et de septicémie. Selon cette dernière phase et après suspicion de colibacillose, on procède au prélèvement des organes à l'aide d'une pince et d'un bistouri.

4.3.2. Prélèvement des organes

Les organes sont prélevés à partir des organes de sujets suspects de colibacilloses, à savoir le cœur, le foie, et la rate. Le prélèvement doit répondre à certains critères essentiels:

- Aucun traitement ne doit être effectué dans les jours précédant le prélèvement
- Le prélèvement doit être fait chez des sujets tout juste mort, ou à partir de sujets moribonds et sacrifiés
- le contenu des intestins, ne doit pas contaminer les prélèvements

Les prélèvements ont été mis dans des pots en plastique stériles étiquetés, et accompagnés d'une fiche de renseignement comportant l'âge, le lieu, le type d'élevage, et les lésions observés (voir appendice A), puis acheminés au laboratoire dans une glacière.

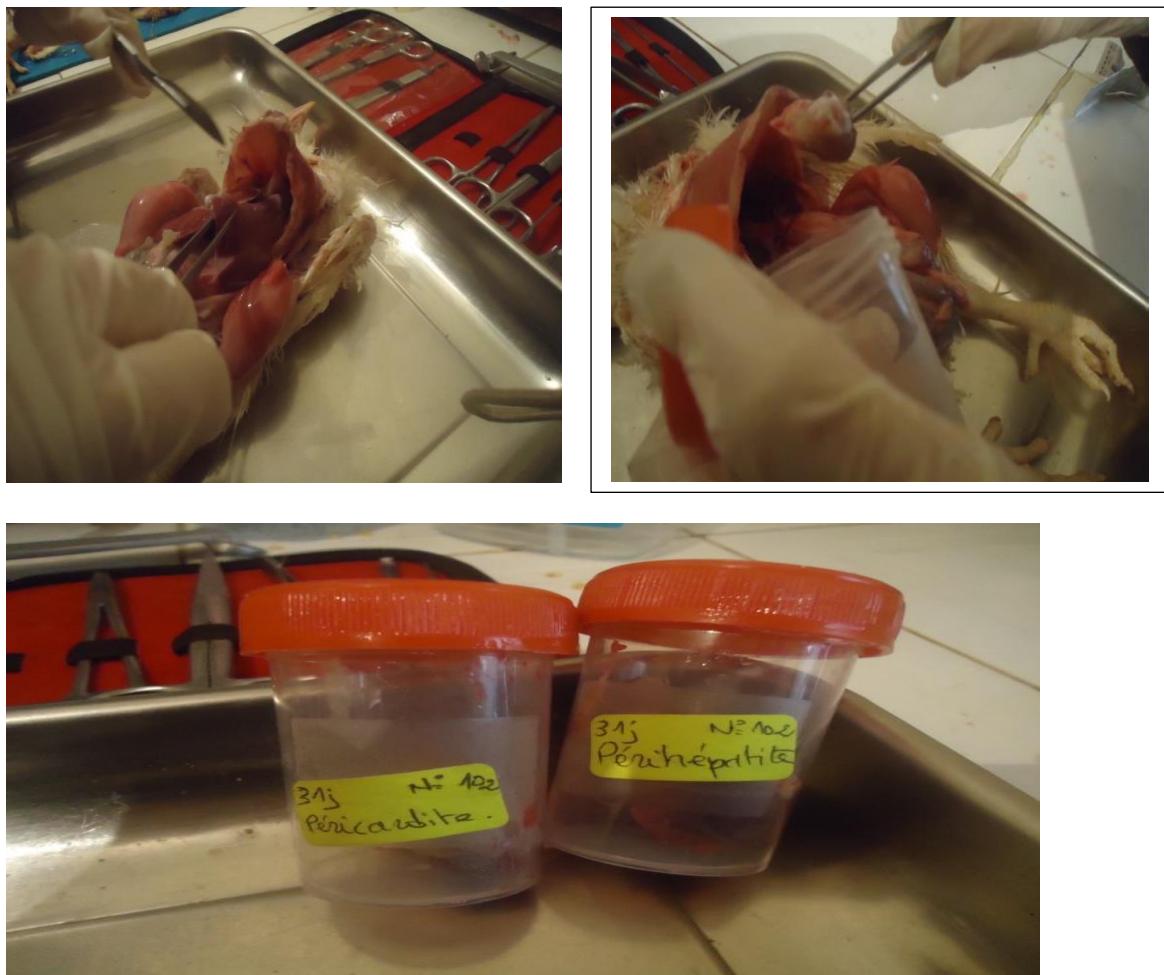


Figure 4.2 : Prélèvement des organes.

4.3.3. Isolement des bactéries

4.3.3.1 Pré-enrichissement

Les organes décongelés sont placés sur la paillasse entre 1 à 2 heures avant leur utilisation, leur surface est flambée, par la suite environ 2 g de chaque organe est découpé et placé dans un bouillon cœur-cervelle (BHIB), puis incubé à 35°C pendant 18h.

4.3.3.2 Isolement

Une goutte de chaque tube de pré-enrichissement est prélevée à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée, puis ensemencée sur gélose Hektoen. Cette gélose est une gélose sélective permettant la culture, à partir de prélèvements biologiques, de toutes les entérobactéries en inhibant les bactéries Gram+. Après 24h d'incubation à 35°C, l'obtention de colonies jaune/saumon est présomptive de la présence d'*E.coli*. Pour la purification, une colonie jaune/saumon caractéristique est choisie puis ensemencée sur une gélose nutritive et incubé à 35°C pendant 18 à 24h.

4.3.4. Identification des *E.coli*

L'identification des colonies commence par la coloration de Gram, et du test oxydase, par la suite, l'identification est réalisée par la galerie miniaturisée API20E® (Bio Mérieux, France).

4.3.4.1 La galerie API 20^E

La galerie API20E est un système standardisé qui permet l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux

La galerie contient des substrats déshydratés correspondant à différents tests biochimiques. Ces tests (microtubes), au nombre de 20, sont reconstitués par la suspension bactérienne à tester. Chaque test est indiqué par un sigle en bas du microtube. Après incubation, des changements de couleur peuvent se produire spontanément ou après ajout de réactifs. L'interprétation se fait grâce à un catalogue analytique comportant toutes les bactéries identifiables grâce à la galerie.

- Préparation de la galerie
 - créer une atmosphère humide en répartissant 5 ml d'eau physiologique à l'intérieur de la boite d'incubation
 - Identifier le prélèvement sur la languette latérale
 - Sortir le test et le déposer stérilement dans la boite d'incubation
- Inoculation de la galerie :

A l'aide d'une pipette pasteur, alors que tous les tubes des tests sont remplis, pour les tests, CIT, VP et GEL remplir les tubes et les cupules de la suspension

bactérienne. Créer une anaérobiose, en remplissant la cupule des tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, par de l'huile de paraffine. Après remplissage, la boite est refermée et incubée pendant 24h à 35°C.

- Lecture de la galerie

Chaque test code pour un chiffre qui va permettre l'obtention du code d'identification de la bactérie. Les changements colorés se produisent spontanément pour tous les tests, sauf 3 tests nécessitent l'addition de réactifs

- Test IND : on ajoute une goutte de réactif JAMES, une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rose
- Test TDA : on ajoute une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive
- Test VP : 2 réactifs (VP 1 et VP 2) sont ajoutés. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge brique après 10 minutes.

Les résultats sont rapportés sur la fiche d'identification, par la suite, il faut se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code obtenu

4.3.5. Conservation des souches

Les colonies ainsi purifiées, et identifiées comme *E.coli* sont transférés sur bouillon BHI additionné de 30% de glycérol et conservés à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

4.3.6. Caractérisation de la résistance aux antibiotiques

4.3.6.1 Antibiogramme

L'antibiogramme est la méthode de référence pour étudier la résistance bactérienne aux antimicrobiens. La méthode de diffusion en gélose selon les normes du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) est la technique qui a été utilisé dans cette étude [135]. Elle consiste àensemencer une gélose Mueller-Hinton avec la souche à étudier, puis par le dépôt de disques imbibés d'antibiotique. La lecture se fait en mesurant le diamètre d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

- Méthode

A partir d'une culture de 18 à 24h, une suspension bactérienne est préparée en ajustant sa turbidité à 0.5 Mc Farland par un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde à 625 nm. La suspension est ensemencée par écouvillonnage sur une gélose Mueller-Hinton (MH). Les disques d'antibiotiques sont déposés après 15 minutes d'adsorption de la suspension bactérienne, ensuite la boite est incubée pendant 18h à 35°C.

Pour toutes les souches, 14 antibiotiques ont été testés : Ampicilline : AMP (10 µg), Amoxicilline-Acide clavulanique : AMC (20/10 µg), Céfotaxime : CTX (30 µg), Céfoxidine : FOX (30 µg), Aztréonam : ATM (30 µg), ceftazidime : CTZ (30 µg), Tétracycline : TET (30µg), Doxycycline : DOX (30 UI), Acide nalidixique : NAL (30 µg), Ofloxacine : OFL (5 µg), Gentamicine : GEN (10 µg), Chloramphénicol : CHL (30 µg), Triméthoprime-Sulfaméthoxazole : SXT (1. 25 / 23.75 µg) et Nitrofurantoïne : F (300 µg).

La souche ATCC 25922 a été utilisée pour le contrôle de qualité de l'antibiogramme.

- Lecture

La lecture se fait par la suite en mesurant le diamètre du cercle qui correspond à l'aire d'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque d'antibiotique.

La valeur mesurée est comparée aux valeurs critiques des tables de lecture qui permettent de classer la souche en 3 catégories (S : sensible, I intermédiaire et R résistante) selon les recommandations du CLSI [135].

Les souches ont été classées comme multirésistants lorsqu'aucune sensibilité à au moins un agent appartenant à trois classes d'antimicrobiens ou plus, a été observée [136].

4.3.6.2 Recherche de la production de β-lactamase à spectre élargi

La recherche de la production de BLSE a été effectuée par la méthode de synergie du double disque. Il s'agit d'ensemencer une gélose MH avec une suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland. Après adsorption, on place les disques de céfotaxime (30 µg), de ceftazidime (30 µg) et d'aztréonam (30 µg) à une

distance de 30 mm du disque d'amoxicilline-acide clavulanique (20/10 µg) [135]. L'incubation est effectuée à 35°C pendant 18 à 24h.

4.3.6.3 Recherche de la CMI de la colistine

La colistine est un antibiotique diffusant mal en gélose, pour cette raison, le CLSI recommande de rechercher la résistance à la colistine par la méthode de microdilution en bouillon (BMD). Cependant, peu de laboratoires ont accès à cette technique [135], [137]. La technique d'élation de disque de colistine sur bouillon (CBDE) est considérée comme une bonne méthode alternative pour tester la colistine, elle est rapide, facile à réaliser et reproductible par rapport à d'autres techniques que certains laboratoires pratiquent, qui nécessitent un temps de préparation considérable et ne sont pas recommandées par le CLSI/EUCAST avec des taux d'erreur élevés.

Dans notre recherche, nous avons réalisé et comparé les résultats des deux techniques CBDE et BMD. La souche ATCC 25922 a été utilisée pour le contrôle de qualité.

- Préparation des suspensions bactériennes

Des colonies fraîches provenant d'une culture d'une nuit sur gélose Trypticase soja agar, ont été suspendues dans une solution saline normale. La turbidité a été ajustée pour correspondre à celle d'un standard de 0.5 Mc Farland, à l'aide d'un spectrophotomètre par une absorbance de 0.080 à 0.100 à une longueur d'onde de 625nm.



Figure 4.3 : Ajustement de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland.

- Préparation de la solution CA-MHB

Cette solution est préparée à partir d'un bouillon MH, auquel on rajoute des cations ($Mg^{+}Cl_2$ et $Ca^{+}Cl_2$).

4.3.6.3.1 Elution de disque de colistine sur bouillon (CBDE)

Sur la base des résultats décrits dans une enquête multicentrique large, le sous-comité des tests de sensibilité aux antimicrobiens (AST) du CLSI a provisoirement approuvé le CBDE pour les tests des Enterobacteriales et *P. aeruginosa* en juin 2019, et publié dans la 30e édition du document CLSI M100 en janvier 2020 [138]. Toutes les souches d'*Escherichia coli* ont été criblés pour la résistance à la colistine en utilisant la méthode CBDE.

La méthode CBDE a été réalisée selon le protocole décrit par Simner et al., 2019 [139] avec quelques modifications. Quatre tubes contenant 10 mL de bouillon Mueller-Hinton ajusté en cations (CA-MHB), ont été préparés, auxquels 0, 1, 2 et 4 disques de colistine (10 µg) ont été ajoutés. La colistine a été éluée en incubant les tubes à température ambiante pendant au moins 30 minutes. La concentration dans chaque tube était respectivement de 0 (témoin de croissance) 1, 2 et 4 µg/mL.

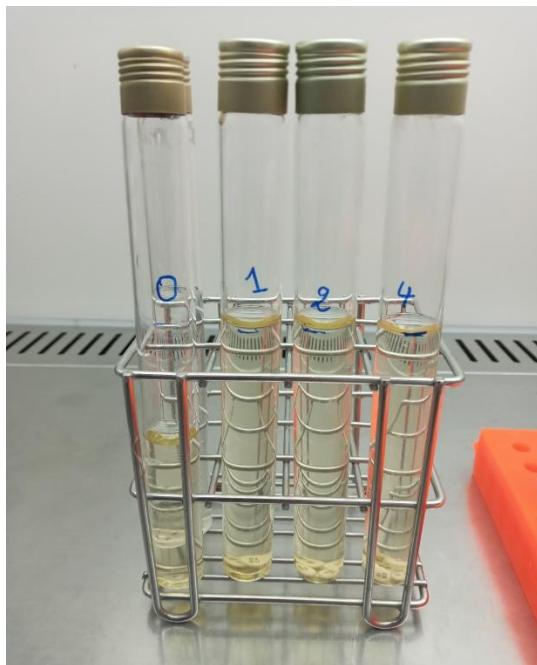


Figure 4.4 : préparation de la technique CBDE

Des aliquotes de 1 ml de chaque tube ont été distribuées dans des tubes Eppendorfs. Chaque tube Eppendorf a été inoculé avec 5 µl de la solution standardisée, qui a été doucement mélangée par vortex pour un inoculum final de $7.5 * 10^5$ UFC/mL. Après une période d'incubation de 16 à 20 heures à 35 °C, les valeurs de CMI de la colistine ont été déterminées visuellement.

4.3.6.3.2 Microdilution en bouillon (BMD)

Tous les isolats déjà testés par la méthode CBDE ont été soumis au test de BMD.

- Préparation de la solution mère primaire

Cette solution a été préparée en suspendant 0.01g de colistine sulfate (puissance 76.96%) dans 7.7mL d'eau distillée. Des aliquotes de 2 mL sur cryotubes, ont été conservés à -80°C.

- Préparation de la solution stock de travail

Cette solution est obtenue en ajoutant 64 µL de la solution stock primaire à 936 µL de CA-MHB, cette solution correspond à une concentration de colistine de 64 µg/mL.

- Préparation des dilutions de colistine

Ajouter 500 µL de la solution mère de travail de 64 µg/mL à 500 µL de CA-MHB et effectuer des dilutions en série (de $\frac{1}{2}$) dans 9 microtubes (MCT) contenant 500 µL de CA-MHB, pour obtenir les concentrations de colistine comme suit : 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL et ainsi de suite jusqu'à 0.125 µg/mL

- Inoculation de la microplaqué

Une microplaqué à 96 puits est inoculée. Ajouter 50 µL de CA-MHB à tous les puits des colonnes 1 à 10 ; 75 µL à la colonne 11 et 100 µL à la colonne 12.

Ajouter les dilutions de colistine à tous les puits des colonnes 1 à 10 dans l'ordre. La colonne 11 représente le contrôle de croissance et la colonne 12 représente le contrôle des milieux.

Préparer l'inoculum en diluant la suspension bactérienne préparée précédemment à 0.5 Mc Farland

Diluer cette suspension bactérienne 1:75 fois en ajoutant 10 µL dans 740 µL de MHB stérile. A partir de cette dilution, prélever 25 µL et les ajouter à chacun des puits des colonnes 1 à 11.

Incuber la plaque de microtitration à 35°C pendant 16 à 20h dans les 15 minutes suivant l'ajout de l'inoculum.

- Interprétation

Lire la CMI de la colistine comme la concentration la plus faible ayant complètement inhibé la croissance bactérienne dans le puits de la microplaqué par une observation à l'œil nu.

Pour que le test soit considéré comme valide, une croissance acceptable (turbidité ou point) doit aussi se produire dans le puits de contrôle de culture.

Une souche est considérée résistante à la colistine, si sa CMI est supérieure à 2 µg/mL (EUCAST, 2022) [137].

4.3.7. Extraction de l'ADN

L'extraction a été réalisée par la méthode d'ébullition, telle que décrite précédemment par Dilhari *et al.*, 2017 [140] avec quelques modifications. Brièvement, il s'agit de suspendre 2 à 3 colonies préalablement inoculées pendant une nuit à 37°C sur la gélose trypticase soja avec 150 µL d'eau exempte de nucléase. Après un chauffage à 98°C pendant 10 minutes au bain Marie, suivi d'une centrifugation à 12000 rpm, le surnageant contenant l'ADN a été extrait et conservé dans des cryo-tubes à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

4.3.7.1 Control de pureté de l'ADN

La spectrophotométrie a été utilisée pour examiner la pureté l'ADN extrait à 230, 260 et 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop, 8000, Thermo Scientific), en utilisant 2 µL d'ADN. Le logiciel du système détermine les rapports d'absorption 260/280 (A260/280) et 260/230 (A260/230) et la concentration de l'ADN en ng/L.

Un ADN de bonne qualité doit avoir une pureté R ((A260/280) qui se situe entre 1.8 et 2, et un rapport (A260/230) supérieur à 1.5.



Figure 4.5 : Control de pureté de l'ADN par Nanodrop

4.3.8. Recherche des gènes *mcr*

La PCR multiplex a été utilisée pour détecter les gènes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* et *mcr-5* chez les souches résistantes à la colistine [141]. La réaction PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µL, celui-ci était composé de : 15 µL d'eau exempte de nucléase(Omega Bio-tek), 0.25 µL de dNTPs (Invitrogen, USA), 0.5 µL de MgCl₂ (50mM ; Invitrogen, USA), 0.5 µL de chacune des 10 solutions d'amorces sens et anti-sens (10 µM) (Eurogentec, Belgique), 0.25 Taq ADN polymérase (5 U/µL ; Invitrogen, USA), 2 µl de 10×buffer (Invitrogen, USA) et 2 µL d'ADN matrice.

L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : dénaturation à 94 °C pendant 15 min, suivie de 25 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 s, hybridation à 58 °C pendant 90s et élongation à 72 °C pendant 60 s, et un dernier cycle d'élongation à 72 °C pendant 10 min. L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose à 1.5 % à 130 V, additionné de SYBR Safe DNA (Invitrogen, USA). Les fragments d'ADN ont été visualisés dans un transilluminateur UV (BIO-RAD Gel Doc XR+) et lus à l'aide du logiciel Image Lab®

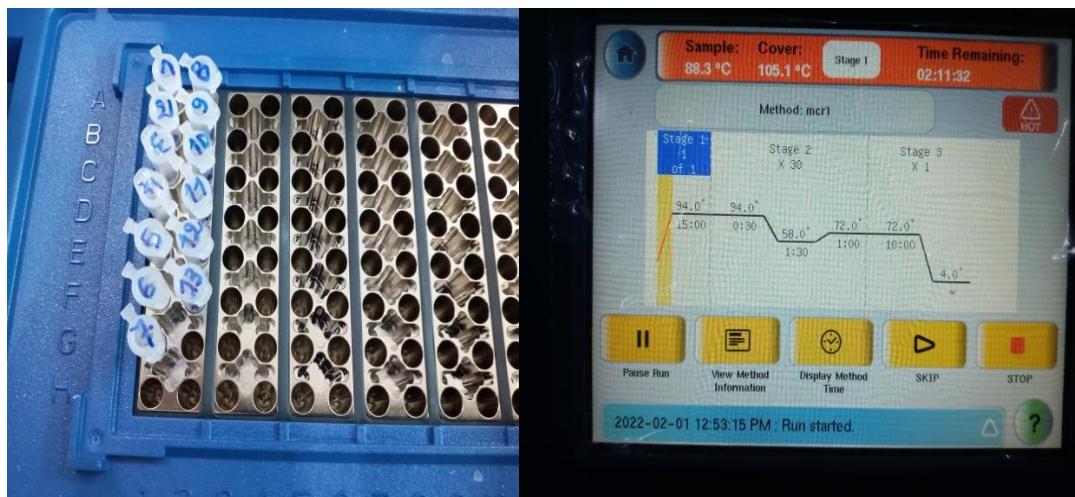


Figure 4.6 : Réaction PCR des gènes *mcr*

Les amores utilisées pour le test PCR sont répertoriées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1: Caractéristiques des amores des gènes *mcr*.

Gène	Séquences d'amores	taille (bp)	Référence
<i>mcr-1</i>	F : AGTCGTTGTTCTTGTGGC R : AGATCCTGGTCTCGGCTTG	320	[141]
<i>mcr-2</i>	F : CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT R : TCTAGCCCGACAAGCATACC	715	
<i>mcr-3</i>	F : AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG R : AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	
<i>mcr-4</i>	F : TCACTTTCATCACTGCGTTG R : TTGGTCCATGACTACCAATG	1116	
<i>mcr-5</i>	F : ATGCGGTTGTCTGCATTTATC R : TCATTGTGGTTGTCCTTTCTG	1664	

4.3.9. Recherche des facteurs de virulence

L'étude de la virulence a été effectuée chez les souches résistantes à la colistine, elle a concerné le profil phénotypique et le profil génotypique

4.3.9.1 Recherche phénotypique

Dans le contexte de la recherche des déterminants de la virulence sur le plan phénotypique des souches d'*E. coli*, quatre tests ont été réalisés : la fixation du rouge Congo, la résistance au sérum, la recherche de l'hémolyse et la formation de biofilm.

4.3.9.1.1 La fixation du rouge Congo

Le test de fixation du rouge Congo a été réalisé selon le protocole de Berkhoff et Vinal 1986 [142]. Ce test permet de différencier les souches invasives des non invasives

- Technique

Les souches ont été ensemencées sur Gélose Trypticase soja additionnée de 0.03 % de rouge Congo. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24h.

- Lecture :

Les isolats d'*E.coli* fixatrices du rouge Congo apparaissent rouges après une incubation de 24 heures à 37°C, les boîtes peuvent être laissées à température ambiante pendant 2 jours supplémentaires (sans dépasser 4 jours). Les colonies blanches sont considérées comme non fixatrices du rouge Congo.

4.3.9.1.2 La résistance au sérum

La résistance au sérum humain a été recherché selon le protocole décrit par Fierer et al., 1972 [143]. Elle correspond à la résistance au système du complément.

- Technique

Le sérum humain utilisé pour ce test, est préparé à partir de sang prélevé sur tube sec à partir d'un individu sain. Le tube est laissé décanter pendant 2 à 4h, puis

centrifugé à 4000 rpm, le sérum est par la suite prélevé ensuite, stérilisé à l'aide d'un filtre de 0.22 µm et conservé à -20°C.

La souche bactérienne à tester est ensemencée sur BHIB pendant 18h à 37°C. Cette suspension est diluée au 1/500, puis ensemencée par écouvillon sur gélose nutritive. Laisser adsorber pendant 15minutes. Après adsorption, déposer au centre de la boite 50 µL de sérum humain qu'il faut laisser adsorber pendant 15 minutes. La boite est incubée à 37°C pendant 24h.

- Lecture :

La souche bactérienne est considérée résistante si elle se développe au point de dépôt du sérum.

4.3.9.1.3 Test de l'hémolyse

L'hémolyse est due à la rupture de la membrane plasmique des globules rouges sous l'effet des hémolysines. La gélose Columbia a été préparée, puis autoclavée et additionnée de sang humain à raison de 5%.

- Technique

La souche bactérienne à étudier est ensemencée par stries sur gélose Columbia additionnée de sang à raison de 5%. L'incubation est effectuée pendant une nuit à 37°C.

- Lecture

Trois cas peuvent être observés :

- Si la digestion des globules rouges est totale, on observe une zone claire autour des colonies, c'est une hémolyse complète: il s'agit de l'hémolyse β ;
- Si la digestion des GR est incomplète, on observe une zone verdâtre autour des colonies, il s'agit d'une hémolyse partielle, c'est l'hémolyse α ;
- La souche testée est non hémolytique : il s'agit de l'hémolyse γ.

4.3.9.1.4 Formation de biofilms

Dans cette étude, les essais de formation de biofilms ont été réalisés comme décrit par Christensen *et al.*, 1985 [144], avec des modifications mineures. Les souches concernées par l'étude de la formation de biofilm sont celles qui ont

présentés une résistance à la colistine. Ces isolats ont été ensemencés pendant 24 heures sur de la gélose Hektoen et incubés à 37°C.

Après 24 heures, et à partir d'une culture pure, quelques colonies ont été inoculées dans 5 ml de TSB, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, la culture a été ajustée à 0.5 McFarland. Une microplaqué à 96 trous a été préparée en remplissant les trous de 1 à 10 avec 150 µL de TSB, suivi de l'ajout de 150 µL de la suspension bactérienne (chacun des dix isolats a été testé en trois exemplaires). Trois trous ont été remplis avec 300 µL de TSB comme témoins négatifs. La microplaqué a ensuite été incubée à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, la suspension bactérienne dans les trous a été jetée, et la plaque a été lavée deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) 1X fixée à 60°C pendant 1 h, suivie d'une coloration avec 150 µL de cristal violet (CV) 0.1% pendant 15min. Après la coloration, la plaque a été lavée trois fois avec de l'eau distillée, ensuite séchée à l'air.

Après séchage de la microplaqué, le contenu des trous est solubilisé avec 150 µL d'éthanol (96%) et laissé pendant au moins 30 minutes.

- Interprétation

La quantification du biofilm formé est réalisée à l'aide de deux méthodes. Tout d'abord, une approche subjective directe connue sous le nom d'estimation visuelle, par laquelle la formation du biofilm est observée visuellement sur les bords du trou. L'apparition d'un anneau variable permet de distinguer les différents isolats.

La seconde méthode est une approche indirecte qui consiste à mesurer la densité optique (DO) à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques, en particulier un lecteur ELISA (Agilent, BioTek 800 TS, USA).

L'évaluation de la formation du biofilm est interprétée en suivant les critères de classification proposés par Stepanović *et al.*, 2007 [145] qui s'appuient sur les valeurs de DO obtenues par le lecteur ELISA reflétant, de ce fait, l'adhésion bactérienne aux surfaces. Ces critères sont présentés dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Interprétation des densités optiques

Valeur DO	adhérence	Interprétation de la formation du biofilm
$OD \leq OD_c$	absence	Absence
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	basse	Faible
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	moyenne	Moyen
$OD > 4 \times OD_c$	élevée	Forte

Valeur limite de la densité optique (OD_c) = valeur moyenne de la DO du control négatif + 3 fois (\times) l'écart type

4.3.9.2 Recherche génotypique

La recherche de la virulence des souches a aussi été réalisée sur le plan génotypique. Sept gènes associés aux facteurs de virulence de l'APEC ont été étudiés par PCR simplex parmi les *E. coli* résistants à la colistine. Le choix des gènes de virulence a été basé sur les travaux de Johnson *et al.*, 2008 [7], où ils ont démontré une différence significative dans la distribution des gènes entre les souches pathogènes aviaires et les souches fécales.

Ces gènes au nombre de 5 sont impliqués dans la résistance au sérum (*iss*), la captation de fer par la salmochéline (*iroN*), le système de transport du fer (*iutA*), l'hémolysine aviaire putative (*hlyF*), et la protéase de la membrane externe (*ompT*).

De plus, deux gènes impliquée dans l'adhésion d'*E.coli* aux cellules hôtes ont aussi fait objet de cette étude ; il s'agit du gène des fimbriae de type 1 (*fimH*) et le gène des fimbriae de type P (*papC*).

Les gènes cibles et leurs descriptions sont résumés dans le tableau 4.3 avec leurs séquences d'amorces respectives.

Tableau 4.3: Caractéristiques des amorces des gènes de virulence.

Gène	Amorce	Taille (bp)	Référence
<i>papC</i>	F : TGATATCACGCAGTCAGTAGC R : CCGGCCATATTACACATAA	501	(Al-Kandari and Woodward, 2019)
<i>ompT</i>	F : ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC R : CCCGGGTCATAGTGTTCATC	559	(Johnson et al., 2006)
<i>iroN</i>	F : AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R : GACGCCGACATTAAGACGCAG	667	(Johnson et al., 2006)
<i>hlyF</i>	F : GGCGATTAGGCATTCCGATACTC R : ACGGGGTCGCTAGTTAAGGAG	599	(Johnson et al., 2006)
<i>fimH</i>	F : AGAACGGATAAGCCGTG R : GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	(Al-Kandari and Woodward, 2019)
<i>iss</i>	F : CAGCAACCCGAACCAC TTGATG R : AGCATTGCCAGAGCGGGCAGAA	323	(Johnson et al., 2006)
<i>iutA</i>	F : GGCTGGACATCATGGAACTGG R : CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	(Johnson and Stell, 2000)

Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel total de 25 µL contenant 19 µL d'eau exempte de nuclease (Omega Bio-tek), 2 µL de tampon 10× (Invitrogen, USA), 0.5 µL de MgCl₂ (50 mM ; Invitrogen, USA), 0.25 µL dNTPs (Invitrogen, USA), 0.5 µL de chacune des amorces sens et anti-sens (10 µM ; Eurogentec, Belgique), 0.25 µL Taq ADN polymérase (5 U/µL, Invitrogen, USA), et 2 µL d'ADN matrice (100 ng/µL).

La détection des gènes *iss*, *ompT*, *iroN*, *hlyF* a été réalisée à l'aide du protocole PCR décrit précédemment par Johnson et al., 2006 (Johnson et al., 2006). Le programme des cycles d'amplification de ces gènes sont comme suit : dénaturation à 94°C pendant 3 min suivi de 35 cycles de 94°C pendant 30 sec ; 55°C pendant 30 sec ; et 72°C pendant 1 min ; et une étape finale d'extension à 72°C pendant 5 min).

Pour la détection du gène *iutA*, les conditions des cycles étaient les suivantes : 94°C pendant 5 min suivi de 30 cycles de 94°C pendant 30 sec ; 63°C pendant 40

sec ; et 72°C pendant 1 min ; et une étape finale d'extension à 72°C pendant 7 min comme décrit précédemment par Johnson et Stell., 2000 [147].

Les gènes *fimH* et *papC* ont été détectés en utilisant les conditions d'amplification suivantes : 94°C pendant 3 min suivi de 30 cycles de 94°C pendant 30 sec, 58°C pendant 30 sec et 68°C pendant 3 min et une étape finale d'extension à 72°C pendant 5 min, selon le protocole décrit par Al-Kandari & Woodward, 2019 [146].

Les produits PCR ont migré dans un tampon 1×TBE sur un gel d'agarose à 1,5 % (GmbH, Allemagne) à 100V. La visualisation des fragments d'ADN a été réalisée à l'aide d'un système de documentation de gel (BIO-RAD Gel Doc XR+) et lue à l'aide du logiciel Image Lab Software®.

4.3.10. Analyse statistique

Les résultats des différents tests étaient saisis sur un classeur Microsoft Excel qui représente notre base de données.

Un test de khi deux a été utilisée pour vérifier l'indépendance des deux variables (résistance à la colistine et antibiorésistance). Lorsque la valeur de p est supérieure à 0.05, les deux variables sont considérées indépendantes.

L'analyse descriptive et les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS, IBM ® ; V.25 2015. La corrélation de la résistance aux antibiotiques et du profil de multirésistance, avec le profil APEC, a été analysée à l'aide du test du Khi-deux de Pearson (χ^2), et du test exact de Fisher (lorsque les valeurs attendues sont <5).

L'association entre les gènes de virulence et le phénotype de résistance a également été effectué par le test exact de Fisher.

4.4. Résultats

La présente étude a pour objectif d'isoler, d'identifier, et de caractériser le profil de virulence et de résistance aux antibiotiques de souches pathogènes aviaires.

A partir des 164 prélèvements réalisés, 100 souches d'*E.coli* ont été isolées, ce qui représente un total de 60.97% des prélèvements effectuées.

4.4.1. Distribution des souches en fonction de l'origine de l'échantillon

Les souches isolées appartiennent à différents groupes d'âges et élevages comme le montre le tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Répartition des souches selon le type d'élevage et l'âge.

Type d'élevage	Poulet de chair			reproducteurs	Poules pondeuses
Nombre de souches	77 souches			6 souches	17 souches
	1-20 j (24)	21-40j (31)	+40j (22)		

Ces résultats indiquent que la majorité des souches isolées proviennent de poulets de chair, avec une prédominance pour la tranche d'âge 21-40 jours (31 sujets), suivie de la tranche d'âge 1-20 jours (24 sujets) et de 22 sujets pour la tranche d'âge +40 jours. Les reproducteurs et les poules pondeuses représentent une proportion moins importante (6 et 17 sujets respectivement)

4.4.2. Les lésions retrouvées

Le prélèvement des échantillons a été réalisé lorsque des lésions présomptives ont été constatées lors de l'examen nécropsique chez les volailles malades ou morts. Les principales lésions sont résumées dans le tableau 4.5. sachant que plusieurs lésions peuvent coexister.

Tableau 4.5 : Fréquence des lésions retrouvées

Lésions	Fréquence
Péribatite	83%
Péricardite	78%
Aérosacculite	52%
Omphalite	34%
Péritonite	33%
Congestion de la rate	25%

Les résultats montrent que la péribatite est la lésion la plus fréquente, suivie de la péricardite et de l'aérosacculite.

Les lésions observées lors de l'examen nécropsique des volailles suspectes de colibacillose, sont présentées dans les figures 4.7.

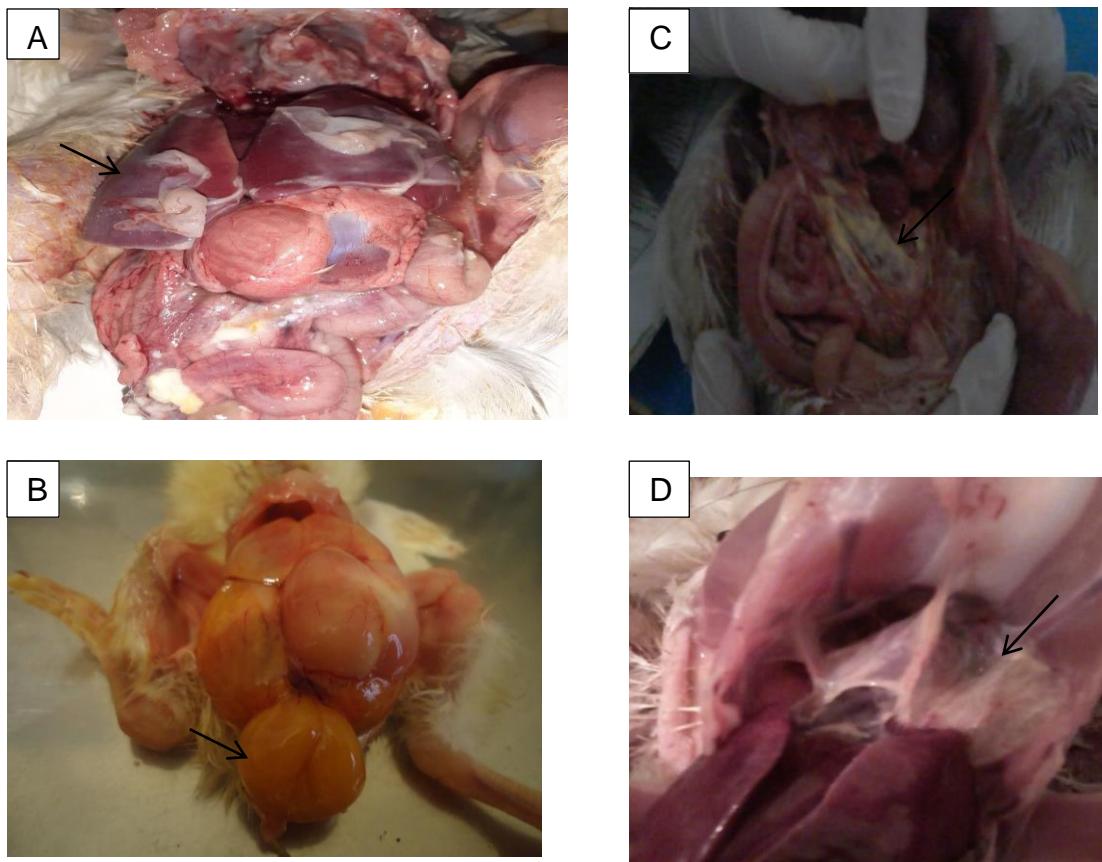


Figure 4.7 : Lésions observées lors de colibacillose.

A : aspect d'une péribatite, B : omphalite, C : péritonite, D : aérosacculite

4.4.3. Identification bactériologique

L'identification des souches a été faite en se basant sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques de la bactérie.

Sur la gélose Hektoen, des colonies de couleur jaune saumon ont été retenues, confirmant le caractère lactose positif des bactéries, comme le montre la figure 4.8.

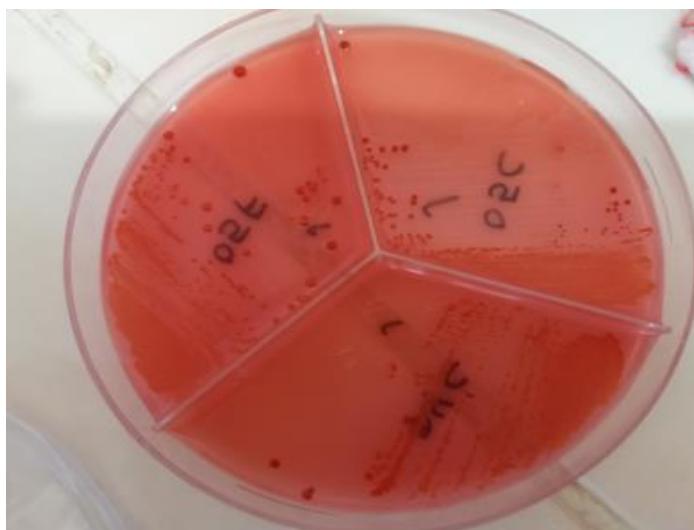


Figure 4.8 : Colonies d'*E. coli* sur gélose Hektoen [photo personnelle].

Après la coloration de Gram, des bacilles à Gram négatif ont été obtenus, comme le montre la figure 4.9.

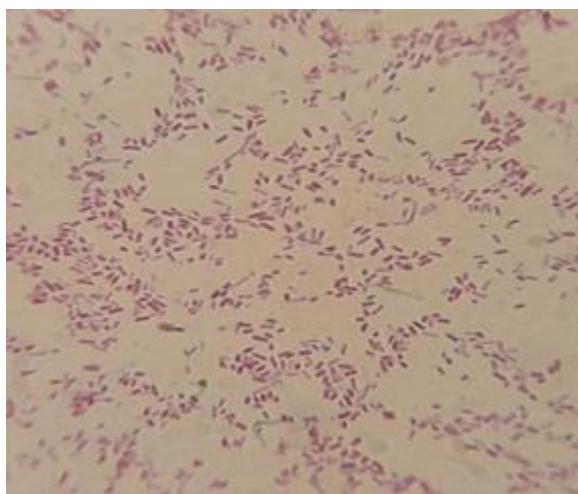


Figure 4.9 : Observation sous microscope optique d'*E. coli* (Gx100).

En utilisant la galerie API 20^E, un profil numérique a été obtenu, confirmant l'appartenance à l'espèce *E.coli*. Un exemple de profil est montré dans la figure 4.10.



Figure 4.10 : Profil biochimique d'*E. coli* sur une galerie API 20^E.

4.4.4. Résultat de l'antibiogramme

Les résultats des antibiogrammes sont catégorisées en Sensible, intermédiaire et résistant, comme le montre le tableau 4.6 et la figure 4.11.

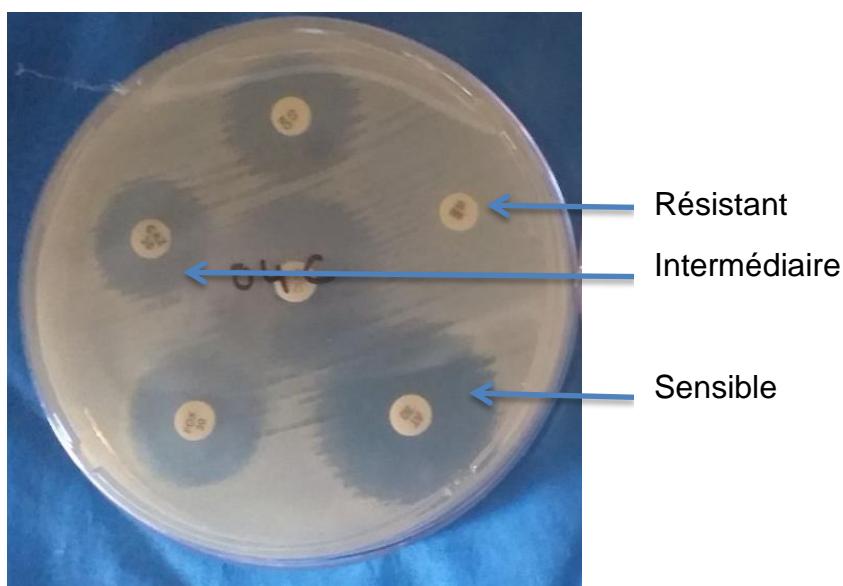


Figure 4.11 : Exemple de résultat d'antibiogramme

Tableau 4.6 : Résultat de l'antibiogramme

Antibiotiques	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Tétracycline	99%	0%	1%
Doxycycline	90%	5%	5%
Ampicilline	89%	3%	8%
Sulfaméthoxazole-triméthoprime	72%	0%	28%
Gentamicine	5%	0%	95%
Oflloxacine	74%	0%	26%
Acide Nalidixique	92%	0%	8%
Amoxicilline+ Acide clavulanique	57%	0%	43%
Nitrofurantoine	8%	9%	83%
Ceftazidime	0%	14%	86%
Chloramphénicol	23%	7%	70%
Aztréonam	0%	0%	100%
Céfotaxime	0%	0%	100%
Céfoxitine	0%	0%	100%

Ces résultats sont présentés sous forme d'histogramme comme le montre la figure 4.12.

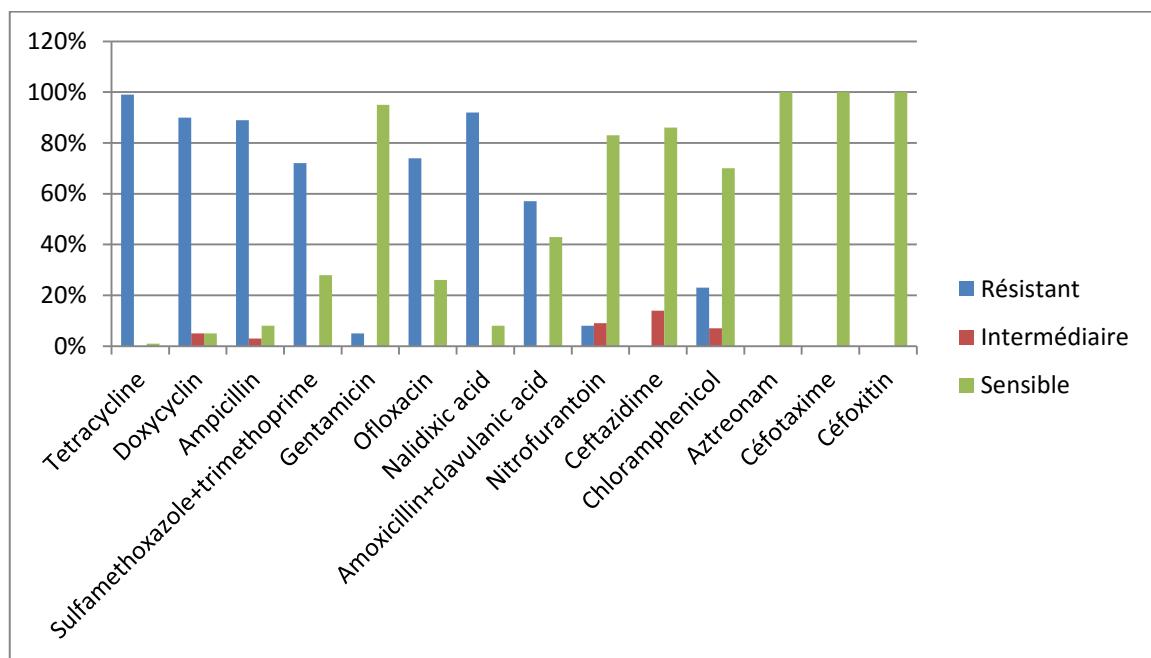


Figure 4.12 : Résultat de l'antibiogramme des souches étudiées.

Pour l'ensemble des souches d'*E.coli*, les résultats de la résistance aux antimicrobiens ont montré une fréquence de résistance élevée à la tétracycline (99%), acide nalidixique (92%), doxycycline (90%), ampicilline (89%), ofloxacin (74%), sulfamethoxazole-triméthoprime (72%) et amoxicilline-acide clavulanique (57%).

La figure 4.13 montre le résultat d'un contrôle de qualité avec la souche de référence ATCC 25922.

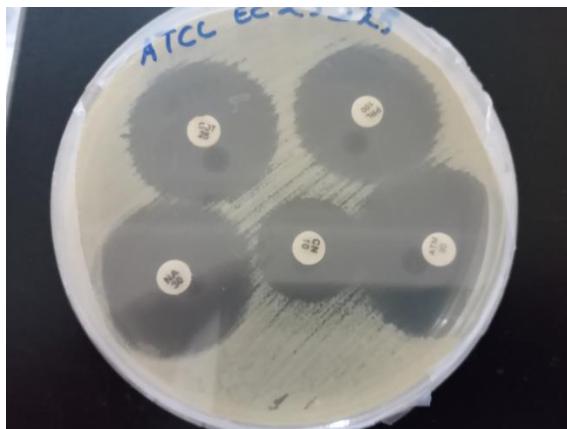


Figure 4.13 : contrôle de qualité des disques d'antibiotiques

- Résultat de recherche des BLSE

La figure 4.14 montre un exemple de recherche de production de BLSE

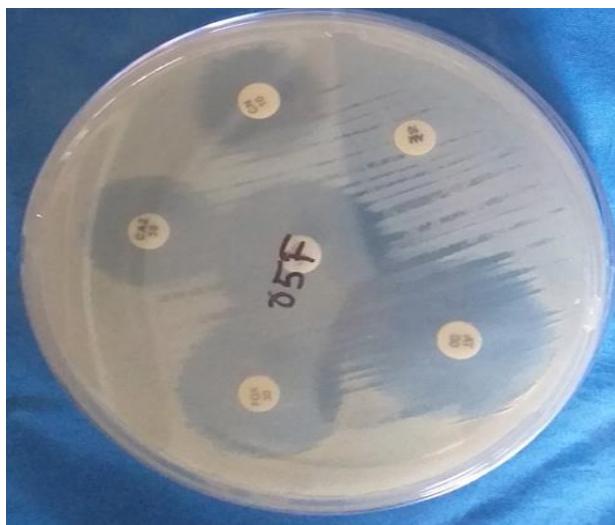


Figure 4.14: Absence de profil caractéristique de BLSE

L'absence d'une image en bouchon de champagne entre les disques révèle l'absence de BLSE

Nos résultats ont montré qu'aucune résistance de type BLSE n'a été détecté chez les souches isolées.

4.4.5. Résultat des CMI à la colistine

4.4.5.1 Résultat du test CBDE

Sur les 100 souches testées, 27 se sont révélées résistantes à la colistine (CMI > 2 µg/mL), la méthode CBDE a montré que 24 souches avaient une CMI > 4 µg/mL, 3 avec une CMI de 4 µg/mL. La figure 4.15 montre les résultats retrouvés dans notre étude

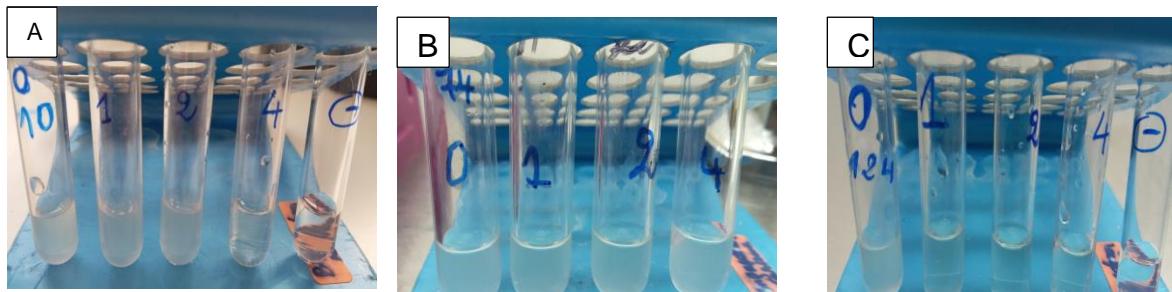


Figure 4.15 : Résultats de la technique CBDE

A : CMI 4µg/mL ; B CMI > 4µg/mL ; CMI 2 µg/mL

4.4.5.2 Résultat du test BMD

Parmi les 100 souches d'*E. coli*, 27 étaient résistantes à la colistine (CMI > 2 µg/mL). Ces souches ont présenté des CMI de 4 µg/mL (6 souches), 8 µg/mL (12 souches), 16 µg/mL (7 souches) et 2 souches avec une CMI > 16 µg/mL. La figure 4.16 montre un exemple de résultat d'une microplaque de CMI de colistine.

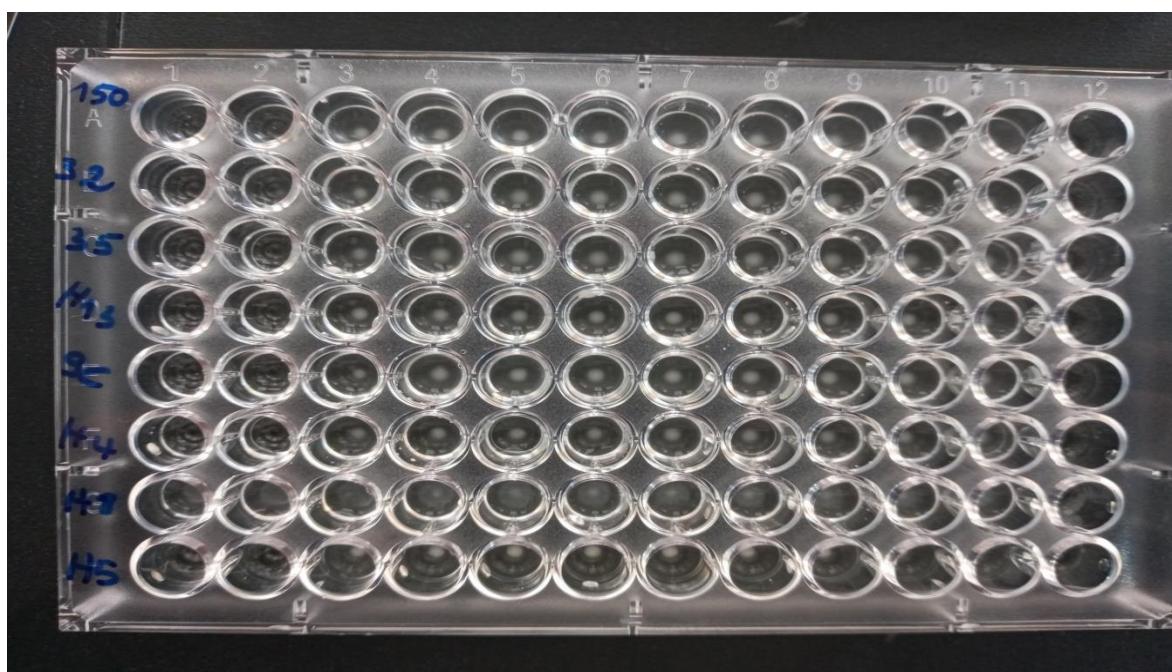


Figure 4.16 : Microplaques de CMI de colistine.

- Interprétation

L'interprétation de la microplaque ci-dessus est présentée dans le tableau 4.7.

Tableau 4.7 : Interprétation d'une microplaque de CMI de colistine

CMI souche \	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	GC	MC
150	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
32	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
35	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H13	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
96	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

GC : growth control, MC : medium control, CMI 150, 32, 35, H13, H5 : 8 µg/mL, CMI H4 : 16 µg/mL, CMI H8 : >16 µg/mL.

Sur cette plaque, nous notons 5 souches qui présentent une CMI de 8 µg/mL, une souche avec une CMI de 16 µg/mL, et une souche avec une CMI > 16 µg/mL.

4.4.6. Profil de multirésistance

Les résultats de multirésistance des souches étudiées sont présentés dans la figure 4.17.

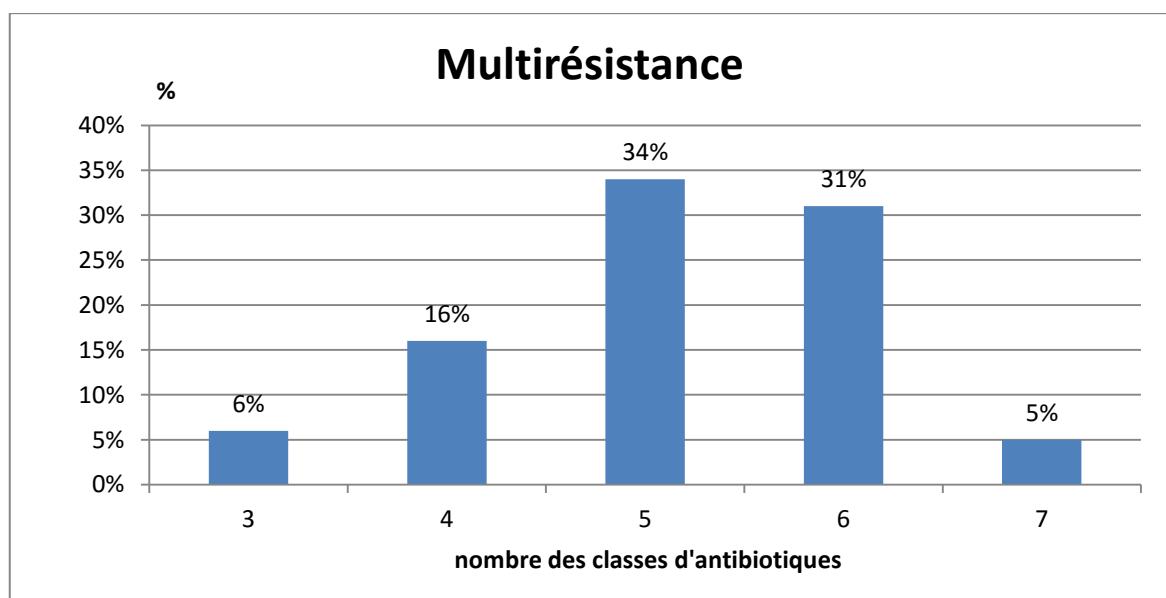


Figure 4.17: Résultats de multirésistance des souches d' *E. coli*

Dans la figure 4.17, on constate que 92 % des souches d'*E.coli* présentaient un profil de multirésistance. Un panel de 6, 16, 34, 31 et 5 souches étaient résistantes à 3, 4, 5, 6 et 7 classes d'antibiotiques respectivement

4.4.6.1 Antibiotypes

Les profils de résistance des souches étudiés ont été classés sous forme d'antibiotypes. Le tableau 4.8 montre les profils les plus fréquemment observés.

Tableau 4.8 : Profil de résistance aux antibiotiques des souches étudiées.

Antibiotype										Nombre
AMP	AMC	NAL	OFL	TET	DOX	SXT			A	16
AMP	AMC	NAL	OFL	TET	DOX	SXT	COL		B	8
AMP	AMC	NAL	OFL	TET	DOX				C	6
AMP	NAL	OFL	TET	DOX	SXT	CHL	COL		D	6
AMP	NAL	OFL	TET	DOX	SXT	CHL			E	6
AMP	AMC	NAL	OFL	TET	DOX	SXT	CHL	COL	F	3
AMP	AMC	NAL	OFL	TET	DOX	SXT	CHL		G	3
AMP	AMC	NAL	OFL	TET	DOX	SXT	F		H	3
AMP	NAL	OFL	TET	DOX	SXT	COL			I	3
AMP	NAL	OFL	TET	DOX	SXT				J	3
Autres										43
Total										100

Au total, 43 profils de résistance (antibiotypes) ont été obtenus dans notre étude. Un nombre de 5 profils de résistance sont plus fréquents : OFL-AMC-SXT-NAL-AMP-TET-DOX (16 souches), AMP-AMC-OFL-SXT-NAL-TET-DOX-COL (8 souches), CHL-AMP-OFL-SXT-NAL-TET-DOX-COL (6 souches), OFL-AMC-NAL-AMP-TET-DOX (6 souches), CHL-AMP-OFL-SXT-NAL-TET-DOX (6 souches).

Ces 5 profils représentent 42% des souches isolées.

Il convient de souligner que le profil de résistance antimicrobien des souches résistantes à la colistine présente la même tendance que celle observée pour tous les isolats, à l'exception de la gentamicine, pour laquelle aucune résistance n'a été détectée, comme le montre la figure 4.18.

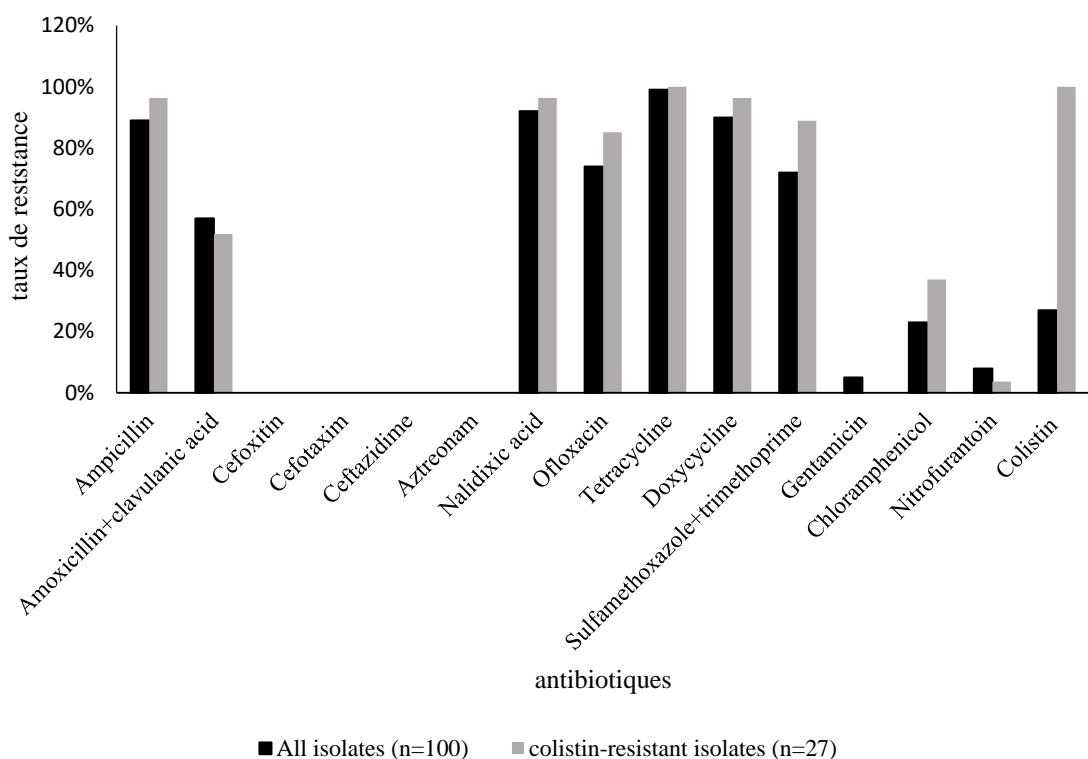


Figure 4.18 : Comparatif de résistance aux antibiotiques chez toutes les souches et chez les souches résistantes à la colistine.

4.4.7. Résultat de recherche des gènes *mcr*

Le résultat de la PCR multiplex de détection des gènes *mcr* est présenté dans la figure 4.19.

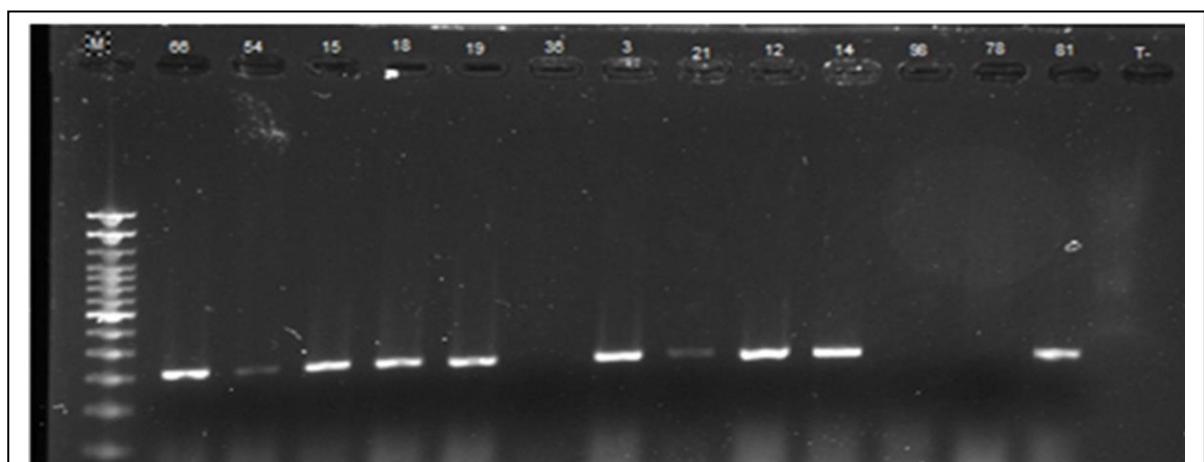


Figure 4.19 : Détection des gènes *mcr* par PCR multiplex

M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, T- : témoin négatif, souche *mcr-1* positives (320 pb) : 66, 54, 15, 18, 19, 3, 21, 12, 14, 81

Parmi les 27 isolats résistants à la colistine, 26 (96,29%), arboraient le gène *mcr-1*, sans détection des autres gènes (*mcr-2* à 5). Les CMI de ces souches étaient comprises entre 4 et $\leq 16 \mu\text{g/mL}$; une souche avec une CMI $> 16 \mu\text{g/mL}$ a été testée négative pour le gène *mcr-1*.

Les souches portant le gène *mcr-1* provenaient de poulets de chair (22 isolats), de poules pondeuses (3 isolats) et de reproducteurs chair (1 isolat).

4.4.8. Profil de virulence

4.4.8.1 Résultats des tests phénotypiques

4.4.8.1.1 Fixation du rouge Congo

La photo montrant la fixation du rouge Congo est présenté dans la figure 4.20.



Figure 4.20: Fixation du rouge Congo.

Le test de fixation du rouge Congo a montré que toutes les souches étaient fixatrices, par l'obtention de colonies de couleur rouge.

4.4.8.1.2 Résistance au sérum

Les résultats du test de résistance au sérum est présenté dans la figure 4.21

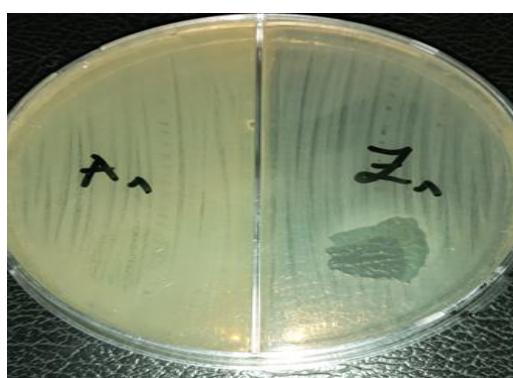


Figure 4.21 : Résultat du test de résistance au sérum.

A1 : souche résistante au sérum ; Z1 : souche sensible au sérum

Le résultat de la résistance au sérum a montré que 26 souches étaient résistantes au sérum et ce, par un développement de culture bactérienne dans le point de dépôt du sérum, une souche s'est révélée sensible au sérum, ceci est observé par l'inhibition de développement de culture bactérienne au point de dépôt du sérum.

4.4.8.1.3 L'hémolyse

Les résultats de l'hémolyse sont présentés dans la figure 4.22.

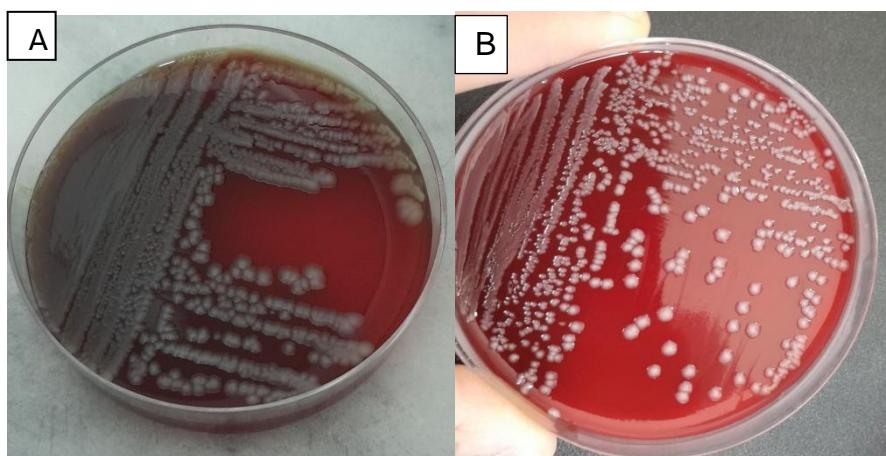


Figure 4.22: Résultat des tests d'hémolyse

A : hémolyse de type α ; B : hémolyse de type δ (non hémolytique)

Les résultats ont montré que 10 souches, ce qui correspond à un pourcentage de 37.01%, présentaient une hémolyse de type α par la présence d'un halo verdâtre autour des colonies, aucune souche n'a présenté d'hémolyse complète de type β , le reste des souches étant non hémolytiques.

4.4.8.2 Formation de biofilm

L'analyse de production des biofilms a été réalisée en 3 répétitions pour chaque souche et l'interprétation a été faite selon les recommandations de Stepanovic *et al.*, 2007. Un exemple de résultat de formation de biofilm sur microplaqué est présenté dans la figure 4.23

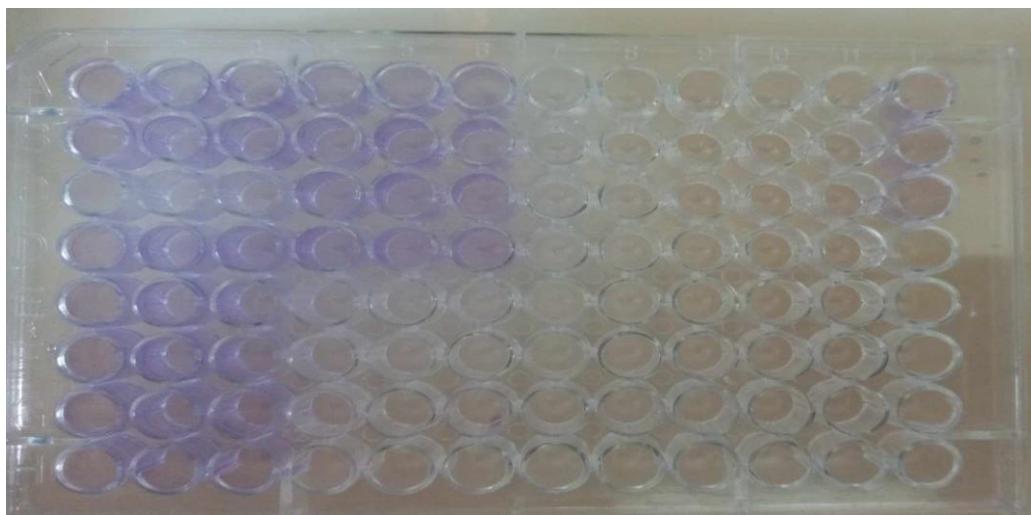


Figure 4.23 : formation de biofilm sur microplaqué

Les résultats des tests des souches testées (résistantes à la colistine) sont présentés dans le tableau 4.9. Ce tableau précise la moyenne des densités optiques obtenus pour chaque souche et son interprétation en type de biofilm formé par rapport à la valeur limite de la densité optique retrouvée $OD_c = 0.056$.

Tableau 4.9 : Valeurs moyennes des DO des isolats testés

Souche	Valeur DO	Type de biofilm	Souche	Valeur DO	Type de biofilm
Ec97	0.074	Faible	Ec31	0.063	Faible
Ec82	0.069	Faible	Ec20	0.072	Faible
Ec86	0.053	Aucun	Ec77	0.067	Faible
Ec54	0.082	Faible	Ec80	0.064	Faible
Ec66	0.070	Faible	Ec30	0.069	Faible
Ec3	0.076	Faible	Ec81	0.070	Faible
Ec14	0.070	Faible	Ec90	0.057	Faible
Ec15	0.086	Faible	Ec95	0.055	Aucun
Ec23	0.082	Faible	Ec96	0.052	Aucun
Ec21	0.073	Faible	Ec36	0.101	Faible
Ec18	0.076	Faible	Ec12	0.088	Faible
Ec19	0.073	Faible	Ec13	0.081	Faible
Ec17	0.069	Faible	Ec85	0.066	Faible
Ec22	0.068	Faible			

Les résultats montrent que 24/27 isolats sont capables de former des biofilms de faible adhérence, alors que 3 souches ne forment pas de biofilms.

4.4.8.3 Gènes associés à la virulence

Les gènes de virulence codant l'hémolysine aviaire (*hlyF*), le système du transport du fer (*iutA*), le système d'acquisition du fer (*iroN*), la protéine de la membrane externe (*ompT*) et le gène de résistance au complément dans le sérum (*iss*) ; ainsi que les fimbriae de type 1 (*fimH*) et P (*papC*) ont été recherché chez les souches résistantes à la colistine et ont tous été retrouvés à des fréquences différentes.

Parmi les 27 souches résistantes à la colistine, trouvées dans cette étude, 25 (92,59%) possédaient au moins 3 gènes de facteurs de virulence.

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose, des gènes étudiés sont présentés dans les figures suivantes.

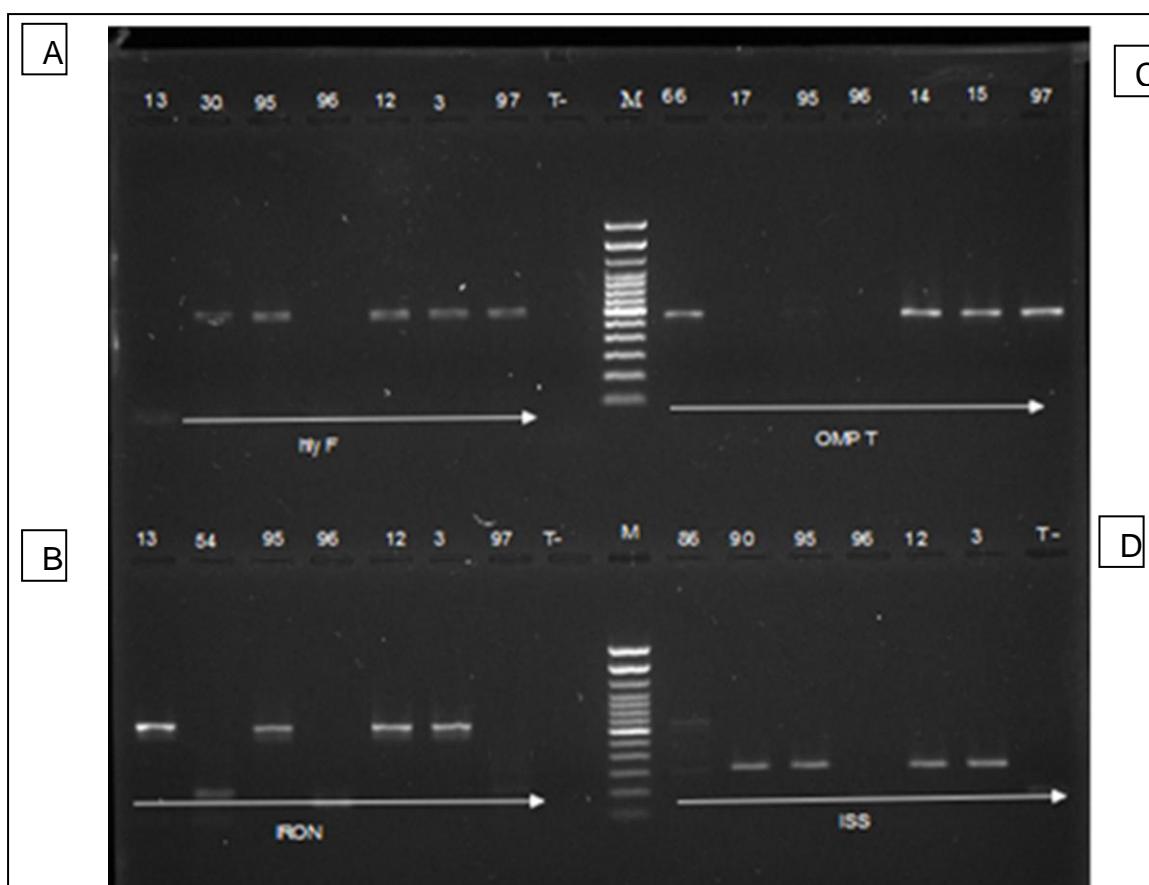


Figure 4.24 : Résultats de PCR des gènes *hlyF*, *ompT*, *iroN* et *iss*

A : M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, T- : témoin négatif, souches *hlyF* positives (599 pb) : 30, 95, 12, 3, 97

B : M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, souches *ompT* positives (559 pb): 66, 14, 15, 97

C : M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, T- : témoin négatif, souches *iroN* positives (667 pb) : 13, 95, 12, 3.

D : M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, T- : témoin négatif, souches *iss* positives (323 pb) : 90, 95, 12, 3.

Les gènes des facteurs de virulence : *hlyF*, *iroN* et *iss* ont été détectés de manière égale chez 21 souches et le gène *ompT* a été retrouvé chez 15 souches.

Les résultats de PCR du gène *iutA* est présenté dans la figure 4.25.

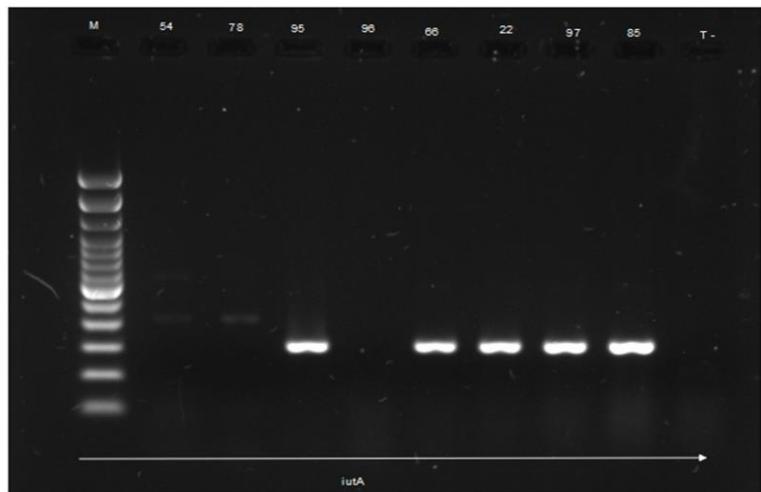


Figure 4.25 : Résultat de PCR du gène *iutA*

M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, T- : témoin négatif, souches *iutA* positives (302 pb) : 95, 66, 22, 97, 85.

Le gène *iutA* a été retrouvé chez 16 souches.

L'amplification du gène *fimH* par PCR est présentée dans la figure 4.26.

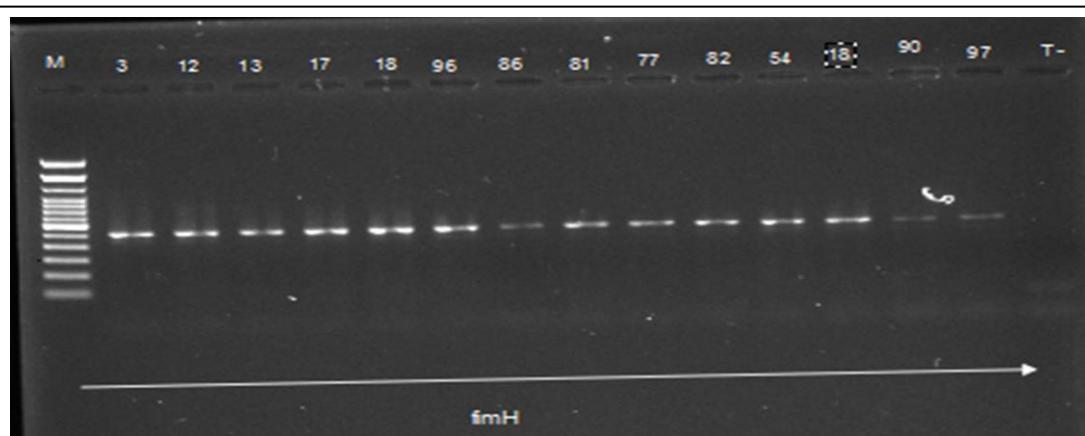


Figure 4.26 : Résultat de PCR du gène *fimH*

M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, T- : témoin négatif, souches *iutA* positives (508 pb) : 3, 12, 13, 17, 18, 96, 86, 81, 77, 82, 54, 18, 90, 97.

Le gène codant l'adhésine des fimbriae de type 1, *fimH*, a été le plus fréquemment détecté (26 souches).

La PCR et l'électrophorèse sur gel d'agarose du gène *papC* est présenté dans la figure 4.27.

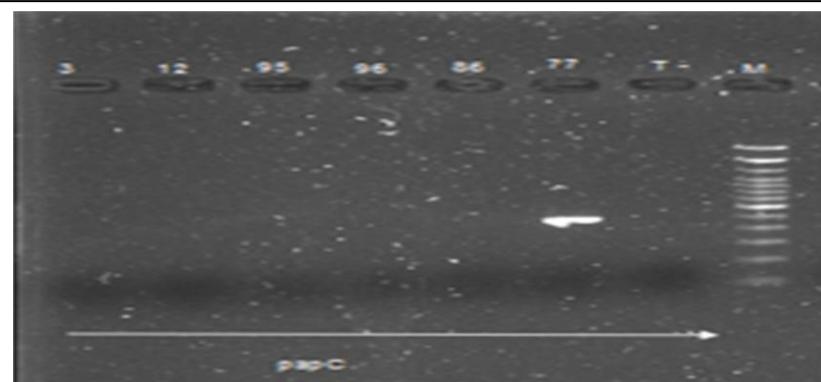


Figure 4.27 : Résultat de PCR du gène *papC*

M : marqueur de taille 100 pb DNA ladder, T- : témoin négatif, souche *papC* positive (501 pb) : 77

Le gène *papC* codant pour les fimbriae de type P n'a été détecté que chez une seule souche, isolée à partir d'une reproductrice.

Les combinaisons de gènes de virulence détectées chez les souches résistantes à la Colistine sont présentées dans le tableau 4.10.

Tableau 4.10: Combinaisons des gènes de virulence et des antibiotypes chez les souches résistantes à la colistine.

Gènes de virulence	Antibiotypes	Origine	Nombre
<i>hlyF-iss-iroN-iutA-ompT-fimH</i>	AMP-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-CHL-COL	Poulet de chair	1
		Poule pondeuse	1
	AMP-NAL-OFL-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
	AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	2
<i>hlyF-iss-ompT-iroN-fimH-papC</i>	AMP-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-CHL-COL	Repro-chair	1
<i>hlyF-iss-iroN-iutA-fimH</i>	AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
	NAL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
	AMP-AMC-NAL-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
<i>hlyF-iss-ompT-iroN-fimH</i>	AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	2
	AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-COL	Poulet de chair	1
<i>hlyF-iss-ompT-iutA-fimH</i>	AMP-NAL-OFL-SXT-TET-DOX- CHL-COL	Poulet de chair	1
<i>HlyF-ompT-iutA-fimH</i>	AMP-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-F-CHL- COL	Poulet de chair	1
	AMP-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-CHL-COL	Poulet de chair	2
<i>hlyF-iss-iroN-fimH</i>	AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-DOX- CHL-COL	Poulet de chair	3
	AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
<i>hlyF-iroN-iutA-fimH</i>	AMP-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
<i>Iss-iroN-iutA-fimH</i>	AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	2
		Poule pondeuse	1
<i>Iss-ompT-iroN</i>	AMP-NAL-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
<i>ompT-fimH</i>	AMP-AMC-SXT-TET-DOX-COL	Poule pondeuse	1
<i>fimH</i>	AMP-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-COL	Poulet de chair	1
Total			27

Les combinaisons des gènes de virulence prédominantes observées chez les souches APEC étaient *hlyF-iss-iroN-iutA-ompT-fimH* (5 souches) et *hlyF-iss-ompT-iroN-fimH* (4 souches).

Le profil le plus répandu associant les facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques chez les *E.coli* résistants à la colistine est : *hlyF-iss-iroN-fimH/AMP-AMC-NAL-OFL-SXT-TET-DOX-CHL-COL*, que l'on retrouve chez trois souches, il présente une résistance à tous les antimicrobiens testés sauf les céphalosporines et les furanes.

- Analyse statistique

Le résultat du test d'indépendance de résistance aux antibiotiques en fonction de la résistance ou sensibilité à la colistine est présenté dans le tableau 4.11.

Tableau 4.11 : Résultats du test d'indépendance

ATB	TET	DOX	AMP	SXT	GEN	OFL	NAL	AMC	F	CHL
Valeur p	0.541	0.05	0.156	0.022	0.003	0.121	0.335	0.527	0.335	0.043

Le test de khi deux a montré qu'il n'existe aucune relation significative pour la résistance des souches aux antibiotiques, parmi les souches sensibles et résistantes à la colistine ($p>0.05$), sauf pour le chloramphénicol, la gentamycine et l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime.

Par ailleurs, les analyses statistiques n'ont révélé aucune corrélation entre la résistance aux antimicrobiens, les profils de multirésistance et le profil APEC des souches ($p> 0.05$).

Le test de Fisher n'a pas révélé d'association entre les gènes de virulence et le phénotype de résistance, les valeurs p sont tous supérieurs à 0.05. Le tableau 4.12 résume les résultats du test.

Tableau 4.12 : Résultats du test de Fisher pour les gènes de virulence et le phénotype de résistance aux antimicrobiens.

	AMP		Pvalue	AMC		Pvalue	TET		Pvalue	DOX		Pvalue	NAL		Pvalue	OFL		Pvalue	CHL		Pvalue	SXT		Pvalue
	R	S		R	S		R	S		R	S		R	S		R	S		R	S		R	S	
<i>IroN</i> +(21)	20	1	1	13	8	0.076	21	0	1	20	1	1	21	0	0.222	18	3	1	6	15	0.153	18	3	1
<i>iron</i> -(6)	6	0		1	5		6	0		6	0		5	1		5	1		4	2		6	0	
<i>Iss</i> +(21)	20	1	1	13	8	0.076	21	0	1	20	1	1	21	0	0.222	18	3	1	7	14	0.638	18	3	1
<i>iss</i> -(6)	6	0		1	5		6	0		6	0		5	1		5	1		3	3		6	0	
<i>OmpT</i> +(15)	15	0	0.44	6	9	0.251	15	0	1	14	1	1	14	1	1	13	2	1	7	8	0.424	13	2	1
<i>ompT</i> -(12)	11	1		8	4		12	0		12	0		12	0		10	2		3	9		11	1	
<i>lutA</i> +(16)	15	1	1	6	10	0.0120	16	0	1	16	0	0.407	16	0	0.407	14	2	1	6	10	1	14	2	1
<i>lutA</i> -(11)	11	0		8	3		11	0		10	1		10	1		9	2		4	7		10	1	
<i>HlyF</i> +(21)	20	1	1	11	10	1	21	0	1	20	1	1	21	0	0.222	19	2	0.204	10	11	0.057	19	2	0.545
<i>hlyF</i> -(6)	6	0		3	3		6	0		6	0		5	1		4	2		0	6		5	1	
<i>FimH</i> +(26)	25	1	1	14	12	0.481	26	0	1	25	1	1	25	1	1	23	3	0.148	10	16	1	24	2	0.111
<i>fimH</i> -(1)	1	0		0	1		1	0		1	0		1	0		0	1		0	1		0	1	
<i>PapC</i> +(1)	1	0	1	0	1	0.481	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0.370	1	0	1
<i>papC</i> -(26)	25	1		14	12		26	0		26	0		25	1		22	4		9	17		23	3	

4.5. Discussion

Au cours des dernières décennies, le phénomène de la résistance aux antimicrobiens parmi les isolats aviaires d'*E.coli* est devenu une préoccupation majeure pour la santé publique. L'utilisation d'antimicrobiens dans l'élevage de poulets a été bien documentée comme une cause possible de résistance aux antimicrobiens chez l'homme, soit par un transfert direct de bactéries, soit par un transfert horizontal des gènes vers des agents pathogènes humains [10].

Des recherches récentes ont montré que les ExPEC humains et aviaires sont comparables, notamment en ce qui concerne leurs gènes de virulence. Cela suggère que les denrées à base de poulet peuvent être une source d'ExPEC qui infectent les humains [148].

Dans le cadre de l'investigation de la situation actuelle de résistance aux antimicrobiens des *E.coli* isolées à partir de volailles atteintes de colibacillose dans nos élevages et afin de contribuer à établir un profil de virulence de ces souches, nous avons entrepris cette étude, compte tenu du risque potentiel de la propagation de résistance à l'homme.

Pour ce faire, à partir des 164 prélèvements provenant de sujets malades, un nombre de 100 souches a été isolé et identifié comme appartenant à l'espèce : *Escherichia coli*, ce qui représente un pourcentage de 60.97%.

Dans l'étude de Radwan *et al.*, en Egypte [149], une prévalence de 41.5% a été retrouvé après identification biochimique des isolats, dans l'étude de Messai *et al.*, en Algérie [150] 83.33% des isolats se sont révélés appartenant à l'espèce *E.coli*, en effet, des variations peuvent exister selon la région d'étude et les sites de prélèvement.

Les souches isolées appartiennent à des catégories différentes d'élevage et d'âge, mais la prédominance est notée pour le poulet de chair (77 souches), suivi des poules pondeuses (17 souches) et enfin les reproducteurs (6 souches). Ces deux dernières catégories d'élevage sont principalement tenues par des groupes d'élevage privés possédant leurs propres vétérinaires, ce qui explique leur faible proportion dans nos prélèvements qui ont été réalisés chez des vétérinaires praticiens privés.

Pour les prélevements chez le poulet de chair, ceux-ci ont été répartis en classes d'âge, avec une prédominance pour la classe d'âge 21-40 jours (31 souches). En effet, les sujets de cette tranche d'âge sont sujets aux infections colibacillaires, vu les facteurs environnementaux (température, humidité, taux d'ammoniac ...) qu'il est nécessaire de maîtriser avec l'augmentation de la densité d'élevage ; La classe d'âge suivante est celle de 1 à 20 jours (24 souches), les sujets atteints sont principalement la conséquence des erreurs provenant des couvoirs, par un manque d'hygiène ou par des transferts verticaux à partir des reproductrices, les mortalités dues aux complications se poursuivent jusqu'à 3 semaines [26].

La dernière classe est celle des sujets de plus de 40 jours (22 souches), la non maîtrise des conditions d'élevage est aussi incriminée dans la survenue de colibacillose chez cette tranche d'âge, dont les formes les plus courantes sont la colisepticémie et la colibacillose respiratoire [26].

Les lésions rencontrées dans cette étude sont principalement : la périhépatite (83%), la péricardite (78%), l'aerosacculite (52%) ; ces lésions ont déjà été décrites par d'autres auteurs tel que Messai *et al.*, [150] qui ont trouvé ces lésions à des fréquences correspondant à notre étude la périhépatite (88.66%), péricardite et aerosacculite (72.66%). Dans l'étude de Aggad *et al.*, [151] des taux plus bas ont été trouvés : aérosacculite (40%), la périhépatite (62%) et la péricardite (31%).

Les antibiotiques dans la filière avicole, sont aussi bien utilisés à titre prophylactique qu'à titre thérapeutique [81]. Une autre utilisation, celle des promoteurs de croissance, fut interdite en 2006. Cette large utilisation exerce une pression de sélection à l'origine de l'émergence et la dissémination de bactéries multirésistantes [82],[152].

La tétracycline est incontestablement l'antibiotique qui présente le taux de résistance le plus élevé (99%). Par le passé, cette molécule était utilisée comme facteur de croissance, et elle est actuellement largement utilisée en production animale en raison de son large spectre. Ceci pourrait expliquer les taux élevés de résistance envers cette molécule, décrit en Algérie [153],[154] mais également dans plusieurs pays : au Maroc par Rahmatallah *et al.*, [155], en Chine par Afayibo

et al., [156] et dans une moindre mesure au Canada par Varga *et al.*, [157] avec des taux de 100%, 95.2% et 57% respectivement).

La doxycycline est également un antibiotique largement utilisée, et une forte proportion de nos souches est résistante (90%) ; comme pour la tétracycline, cet antibiotique est très utilisé dans les infections colibacillaires, la résistance est due aux protéines de protection ribosomale (PPR) qui confèrent une résistance croisée pour les tétracyclines et la doxycycline [110].

Les quinolones et fluoroquinolones présentent des taux élevés de résistance parmi nos souches : acide nalidixique (92%) et ofloxacin (74%). En effet, le large spectre des fluoroquinolones, la bonne diffusion dans les tissus cibles (cœur, poumons, sang....) et l'action dose dépendante, en fait des molécules de choix pour le traitement de la colibacillose [158]. Des résultats similaires ont été retrouvés dans d'innombrables études [154],[159],[160].

Il est à noter que l'émergence de bactéries résistantes aux fluoroquinolones est préoccupante vu l'importance de ces antibiotiques, considérés comme critiques, car réservés aux traitements de dernière intention et aux bactéries multirésistantes en médecine humaine [161],[162].

En ce qui concerne les β -lactamines, une forte prévalence de résistance est retrouvée chez nos souches : pour l'ampicilline (89%) ; pour l'association amoxicilline-acide clavulanique, le taux de résistance est de 57%. Ceci indique la forte utilisation de ces molécules en filière avicole. Ces résultats correspondent à ceux trouvés par Radwan *et al.*, en Egypte [149] avec un taux de 100% des souches qui étaient résistantes ; au Népal, 98% des souches étaient résistantes à l'ampicilline [163]. Rappelons que la résistance aux molécules de cette famille est principalement due à la production de β -lactamases, aux protéines d'efflux responsables de l'excrétion de l'antibiotique hors de la cellule bactérienne, ainsi qu'à la diminution de l'expression de porines [91]. Toutefois, aucune résistance n'est observée pour la céfotaxime, ceftazidime, l'aztréonam et la cefoxitin qui sont des molécules non employées en filière avicole.

L'association sulfaméthoxazole-triméthoprime présente également une forte prévalence de résistance parmi nos souches (72%), d'autres études ont trouvé des résultats similaires, notamment en Algérie (Annaba) avec 96.6% des souches

d'*E.coli* prélevés à partir de viande de poulet étaient résistantes à l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime [159], une autre étude au Népal [163] a révélé que 90% des souches APEC étaient résistantes à ces molécules. En effet, Leur double action (anti-infectieux et anticoccidien), et leur activité bactéricide mène à une utilisation accrue avec comme répercussion un développement de résistance aux deux molécules.

Le profil de multirésistance des *E. coli* isolés des échantillons de volaille et les taux importants de résistance aux agents antimicrobiens testés sont en accord avec des travaux antérieurs réalisés en Algérie : à Tizi-Ouzou par Meguenni *et al.*, 2015 [158] (100%), dans le centre par Halfaoui *et al.*, 2017 [164] (98.7%), à l'est par Mohamed *et al.*, 2018 [154] (100%) et Meguenni *et al.*, 2019 [153] (53.5%), avec des niveaux élevés de résistance à la Tétracycline, à l'Ampicilline, à l'Ofloxacine, et au Sulfaméthoxazole-Triméthoprime. Avec la même tendance, 90.4 %, 94% et 96 % des isolats étaient multirésistants, respectivement en Égypte par Radwan *et al.*, en 2014 [149], au Népal par Subedi *et al.*, en 2018 [163], et en Tunisie par Dhaouadi *et al.*, 2020 [165]. En Algérie, les antibiotiques sont fréquemment utilisés pour prévenir et traiter la colibacillose [166][154], par conséquent, l'abus d'antibiotiques ou la mauvaise utilisation dans les élevages de volailles peut contribuer à l'acquisition de résistances à différentes molécules, notamment lorsqu'aucun antibiogramme n'est appliqué [157]. Ceci corrobore avec les profils de résistance retrouvés qui incluent les antibiotiques les plus utilisés en filière avicole.

La colistine est largement utilisée pour prévenir et traiter la colibacillose [166]. C'est également un antibiotique important utilisé en dernier recours pour le traitement des infections bactériennes à Gram négatif multirésistantes chez l'homme [167].

Dans nos résultats, les méthodes CBDE et BMD montrent des résultats similaires, avec un nombre de 27 souches qui se sont révélées résistantes à la colistine, avec des valeurs de CMI comparables, à l'exception de 3 souches qui ont donné une CMI de 8 µg/mL par BMD et 4 µg/mL par CBDE. Dans l'étude de Humphries *et al.*, 2019 [168], des erreurs similaires ont été rapportées, elles sont causées par des souches exprimant le gène *mcr-1*, qui sont connues pour avoir des CMI qui chevauchent les valeurs critiques.

La prévalence élevée de la résistance à la Colistine (27%), a également été rapportée dans les pays d'Afrique du Nord tels que la Tunisie (24%) par Dhaouadi *et al.*, en 2020 [165], et l'Égypte (25 %) par Badr *et al.*, en 2022 [169]. Toutefois, un rapport récent de Mead *et al.*, [170] dans plusieurs pays européens a montré une faible proportion de résistance phénotypique à la colistine chez les *E. coli* isolés dans des élevages avicoles : au Danemark (4.2 %), en France (2.63 %), aux Pays-Bas (0 %) et au Royaume-Uni (1.67 %). Cette différence de résistance à la colistine entre les pays peut être liée aux différentes pratiques d'élevage appliquées dans les pays d'Europe et d'Afrique du Nord [167].

Pendant de nombreuses années, la résistance à la colistine n'a pas été considérée comme un problème clinique parce que les déterminants génétiques de la résistance à la colistine étaient chromosomiques et qu'aucun cas de transmission horizontale n'avait été signalé [132]. La première description de la résistance à la colistine médiée par un plasmide (*mcr*)-1 a été faite en Chine par Liu *et al.*, [132], et il y a eu une propagation du gène *mcr* et de ses variantes (*mcr*-1 à 10) [171] dans différents pays du monde [167]. En Algérie, le gène *mcr*-1 a été isolé à partir de différentes sources : volailles [172],[173], pigeons [174], échantillons environnementaux [175], eau de mer [176], et légumes frais [177]. Toutefois, à notre connaissance, notre étude est la première à décrire le gène *mcr*-1 dans les isolats pathogènes aviaires, en Algérie.

Parmi les gènes *mcr* testés, cette étude a révélé que le gène *mcr*-1 était le principal déterminant de la résistance à la colistine chez nos souches APEC. Plusieurs rapports indiquent également que la résistance à la colistine est principalement médiée par le gène *mcr*-1, les résultats de Chaalal *et al.*, [178] ont montré que le gène *mcr*-1 était détecté dans toutes les souches d'*E. coli* résistantes à la colistine. En Tunisie, 7 des 12 isolats présentant une résistance à la colistine étaient porteurs du gène *mcr*-1 [165]. Dans une revue systématique incluant des études réalisées en Afrique du Nord, sur un total de 208 souches *mcr*-positives, 193 (92,8 %) possédaient le gène *mcr*-1[179].

Les souches *mcr*-1 positives de cette étude avaient des valeurs de CMI comprises entre 4 et $\geq 16 \text{ } \mu\text{g/mL}$. D'autres études ont trouvé des résultats similaires, en Tunisie, sur les 50 souches d'*E. coli* provenant d'élevages de volailles atteints de colibacillose, 12 ont été classés comme CREC (colistin-resistant *E. coli*), car ils

présentaient une valeur de CMI de 4 µg/mL (6 souches) et 8 µg/mL (6 souches) [165]. Une étude sur la détection des gènes de résistance à la colistine dans l'APEC au Pakistan par Azam *et al.*, en 2017 [180] a montré qu'un isolat de l'APEC hébergeait le gène *mcr-1* avec une CMI de colistine de 8 µg/mL, déterminée par la méthode de microdilution en bouillon. Des résultats similaires ont été rapportés par une étude réalisée au Bangladesh par Amin *et al.*, en 2020 [181], où la majorité des souches (9 sur 14) avaient une CMI de 16 µg/mL ; en Corée du sud, le gène *mcr-1* a été détecté dans 0,10% (11/10576) des souches présentant des CMI à la colistine comprises entre 8 et 16 µg/mL et provenant de 10 fermes différentes [182]. Dans une autre étude menée en Chine [183], 1 136 souches d'*E. coli* ont été prélevées entre 2010 et 2015 sur des poulets malades dans 20 provinces et municipalités chinoises, ils ont trouvé un total de 58 (5,11 %) souches *mcr-1*-positives dont les CMI de colistine pour ces souches allaient de 4 à 16 µg/mL.

On sait que le gène *mcr-1* est généralement associé à des valeurs de CMI faibles, comprises entre 2 et 8 µg/mL [132]. Par conséquent, dans notre étude, le gène *mcr-1* a été trouvé dans une souche parmi deux ayant une CMI > 16 µg/mL ; il a été suggéré que des mutations dans les kinases sensorielles liées à la résistance à la colistine *pmrB* et *phoQ* peuvent également se produire dans les isolats positifs au gène *mcr-1* et moduler la CMI à la colistine [184][185]. Pour certaines autres souches, il a été observé que les souches résistantes à des CMI élevées perdaient plus facilement les plasmides *mcr-1*. Pour ces souches, la perte du gène *mcr-1* n'a pas entraîné de modification de leur CMI et elles sont restées résistantes à la colistine. Le gène *mcr-1* n'était donc pas essentiel à leur survie [186].

Dans notre étude, les souches *mcr-1* positives étaient multirésistantes (MDR) et présentaient des taux élevés de résistance à la tétracycline, à la doxycycline, à l'ampicilline, à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine, au sulfaméthoxazole-triméthoprime. Nos résultats sont en accord avec ceux de Touati. M *et al.*, 2020 [175], où les 8 *E.coli mcr* positifs isolés de sites agricoles à Oran, ont montré une résistance à l'amoxicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique, à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine et au Sulfaméthoxazole-Triméthoprime. Toutefois, cette dernière étude n'incluait pas les isolats cliniques de volaille. Dans une autre étude réalisée en Égypte, les souches *mcr*-positives ont montré une forte résistance au

SXT (72.58 %) et à l'AMC (37.10 %) [187]. Une autre étude réalisée en Chine a montré que sur 58 souches *mcr-1*-positives collectées, 54 (93,1 %) étaient multirésistantes [183]. Ces résultats, y compris les nôtres, indiquent que la majorité des antibiotiques autorisés pour un usage vétérinaire co-sélectionneraient facilement la résistance à la colistine dans l'intestin de la volaille, car la plupart des gènes qui codent pour la résistance à la colistine sont localisés sur des plasmides qui transfèrent des gènes déterminants résistants à d'autres antimicrobiens par conjugaison, conférant ainsi le phénotype MDR [185]. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour rechercher une co-localisation probable du gène *mcr-1* avec les gènes de résistance aux antibiotiques sur un seul plasmide parmi nos souches.

En plus de la résistance aux antimicrobiens, la virulence détermine la pathogénèse des infections dans l'hôte et permet de comprendre les mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène.

Dans notre étude, toutes les souches se sont révélées fixatrices du rouge Congo, ce résultat correspond à celui trouvé par Radwan *et al.*, 2014 en Egypte [149], et Adam *et al.*, 2022, en Libye [188], où toutes les souches étaient fixatrices du rouge Congo. Cette propriété est caractéristique des souches virulentes, en effet, la capacité de liaison au rouge Congo est utilisée comme critère phénotypique de marqueur épidémiologique de discrimination des souches invasives des non invasives [142]. Berkhof et Vinal ont trouvé que toutes les souches isolées à partir des organes internes étaient RC positives [142].

La résistance au sérum est aussi un indicateur de virulence des souches car, leur permettant d'échapper au système immunitaire [8]. Dans nos résultats, nous avons trouvé que toutes les souches étaient résistantes au sérum, excepté une, celle-ci s'est révélé ne portant aucun facteur de virulence, excepté celui de l'adhésine FimH. D'autre part, sur le plan génotypique, le gène *iss*, gène impliqué dans la survie des bactéries dans le sérum, a été retrouvé chez 21 souches des 27 testés, cette différence indique le rôle partiel du gène *iss* dans la résistance au sérum, d'autres gènes peuvent être impliqués.

L'hémolyse est une des caractéristiques des souches virulentes des APEC car elle permet de contourner le mécanisme de défense de l'hôte par la production d'hémolyse, qui entraîne la libération de fer dans l'environnement bactérien et un effet cytotoxique sur les neutrophiles [189]. Dans notre étude 37.03% des souches

étaient à hémolytiques, ces résultats concordent avec l'étude de Radwan *et al.*, [149] où ils ont trouvé que 41% des souches étaient hémolytiques. En Iraq, une étude similaire par Al Saidi et El Mayah [190] a montré que (37.03 %) des isolats d'*E. coli* étaient capables de produire une hémolyse.

La formation de biofilm permet de connaître la capacité des souches à adhérer aux surfaces biotiques et abiotiques, ce qui représente un véritable facteur de virulence du fait de la colonisation des surfaces et de la capacité d'échapper à la destruction par différents désinfectants. La croissance dans les biofilms présente certains avantages pour l'APEC, notamment la facilitation de l'échange de gènes associés à la résistance aux antibiotiques et à la virulence par transfert horizontal de gènes entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes [191].

Notre étude a révélé que la majorité des souches forment des biofilms de type faible, alors que 3 souches n'étaient pas capables de produire de biofilm. Ces résultats correspondent à ceux de l'étude de Skyberg *et al.*, 2007, [192] qui ont trouvé qu'aucune souche d'origine aviaire n'était capable de former des biofilms de forte adhérence. Il est important de noter que la formation de biofilm est un processus complexe largement influencé par divers facteurs environnementaux et génétiques [193].

Il convient de souligner que la méthode de coloration au cristal violet, présente plusieurs biais et plusieurs variations de la méthode existent, ce qui peut conduire à des résultats parfois différents selon le temps d'incubation, le milieu de culture ou la durée de coloration, de lavage ou de séchage [192].

D'autre part, sur le plan génotypique, notre enquête a révélé qu'un nombre important de souches résistantes à la colistine, hébergeaient des déterminants de virulence qui impliquaient l'acquisition du fer, l'adhésion, la résistance au sérum et l'expression de toxines. Les gènes les plus fréquemment trouvés étaient *iroN*, *iss* et *hlyF* (77.77%). Ces résultats sont en accord avec les études précédentes réalisées en Algérie par Mohamed *et al.*, en 2018 [154], et Meguenni *et al.*, en 2019 [153]. En Égypte, des résultats similaires ont été trouvés par Ahmed *et al.*, pour les gènes *iroN*, *iss* (80.02 % chacun) [194] et par Radwan *et al.*, pour les gènes *iroN*, *hlyF* (80 % chacun) [149].

Le gène de l'hémolysine aviaire *hlyF* influence également la virulence des APEC, ce qui explique sa prévalence élevée parmi nos souches [195].

Aussi, l'impact du système de captation de fer *iroN* sur la progression de l'infection est très important grâce à sa grande affinité pour le fer et son insensibilité à l'inactivation par la lipochaline [42].

Le gène *iutA*, un des cinq gènes de l'opéron aerobactine qui code pour une protéine impliquée dans le transport de Fe⁺³ [8],[64], et l'*ompT* qui code pour la protéase de la membrane externe qui clive les colicines [196]; ont été détectés à des taux respectifs de 59.25% et 55.55%. Les résultats diffèrent d'une étude à l'autre. Le gène *iutA* a été fortement détecté par Ahmed *et al.*, [194] (78%), contrairement à Radwan *et al.*, [149] (5%), et Meguenni *et al.*, [153] (13.9%). Le taux de détection de l'*ompT* était en accord avec l'étude de Meguenni *et al.*, [153] mais inférieur à celui rapporté par Mohamed *et al.*, (2018). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'occurrence des gènes de virulence peut différer selon les pathotypes et les régions [197].

Sur la base de la combinaison des cinq gènes de virulence revendiqués par Johnson *et al.*, [7] comme marqueurs de l'APEC, plus de 90% de nos souches hébergeaient au moins trois gènes de virulence. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents rapportés en Algérie par Mohamed *et al.*, 2018 [154] et Meguenni *et al.*, 2019 [153] et dans d'autres pays : en Egypte par Ahmed *et al.*, (80.2%) [194], et Radwan *et al.*, (80%) [149], au Canada par Varga *et al.*, (94%) [157].

En ce qui concerne les gènes des fimbriae, plus de 96% de nos souches possédaient le gène *fimH*. Ceci est en accord avec les résultats d'Al-Kandari et Woodward [146] et de Xu *et al.*, [198]. L'adhésine FimH permet la colonisation et le développement de biofilms [39]. Elle renforce la capacité des bactéries APEC à adhérer et à coloniser les cellules de l'hôte au cours des premiers jours de l'infection [3]. Cependant, cela ne signifie pas que toutes les souches dotées de *fimH* sont potentiellement virulentes [146].

Le gène *papC* a été identifié dans une souche. Une autre étude réalisée en Algérie a obtenu un résultat similaire [153]. De même, le *papC* a été identifié dans 4,5% des isolats dans l'étude de Al-Kandari et Woodward [146]. Les fimbriae P ne sont pas considérés comme marqueur de l'APEC, ils sont impliqués dans l'adhérence, cependant ils ont été décrits que chez des souches colonisant les organes internes [32].

D'autre part, il ressort de nos résultats que l'expression des gènes *fimH* et *papC* n'augmente pas la possibilité de formation de biofilms, d'autres facteurs étant plus impliqués dans ce processus comme les facteurs environnementaux, la température ou le pH. D'autres études attestent que les curli jouent un rôle crucial dans la formation de biofilms [192]. Dans l'étude de Grakh *et al.*, [199] sur la formation de biofilm chez les souches APEC, il s'est révélé que la présence de gènes associés aux biofilms ne suffisent pas pour la formation de biofilm, car 14 isolats APEC bien que possédant 3 gènes, n'ont pas pu produire de biofilm, cette constatation indique que c'est plutôt le niveau d'expression des gènes liés au biofilm qui est à l'origine de la formation du biofilm qui peuvent être régulés dans le temps ou dans l'environnement, qui devrait être évalué.

Les souches APEC peuvent être génétiquement très diverses et posséder un répertoire unique de gènes de virulence [5][6]. De toute évidence, les isolats étudiés sont certainement diversifiés et présentent des profils de pathogénicité différents, mais certains d'entre eux sont considérés comme potentiellement très virulents car ils possèdent quatre ou cinq gènes de virulence [7][200].

La détection de la résistance à de multiples agents antimicrobiens et la présence de plusieurs gènes considérés comme importants pour la virulence de l'APEC sont préoccupantes, car les infections par des souches virulentes et multirésistantes d'*E. coli* pourraient entraîner des pertes économiques substantielles dans les élevages de poulets de chair, en raison d'une morbidité et d'une mortalité accrues et d'un manque d'options de traitement antimicrobien efficaces.

CONCLUSION

La résistance aux antimicrobiens est un problème mondial critique qui concerne les êtres humains, l'environnement et les animaux. Une mauvaise gestion d'utilisation d'antimicrobiens dans divers secteurs (agriculture, élevage et médecine humaine) un contrôle inadéquat des infections et le mouvement de personnes et d'animaux, infectés par des bactéries résistantes, facilitent la propagation de la résistance dans l'environnement.

Notre étude a révélé des taux importants de résistance aux antimicrobiens, avec détection des *E. coli* résistants à la colistine et possédant le gène *mcr-1*, qui sont largement disséminés dans les élevages de volailles situés dans la région d'étude. Ces souches sont résistantes à diverses classes d'antibiotiques et, de surcroît, présentent un potentiel de virulence important. Il s'agit d'un problème de santé publique en raison du partage de l'arsenal thérapeutique entre la médecine humaine et vétérinaire, plus particulièrement la colistine qui est un antibiotique essentiel utilisé en médecine humaine pour le traitement des infections due aux à des bactéries multirésistantes.

Les résultats de cette étude mettent en lumière les profils de résistance aux antimicrobiens et de virulence de l'APEC, et offrent des informations essentielles aux vétérinaires pratiquant dans la filière avicole pour prendre des décisions liées au traitement de la colibacillose chez les poulets de chair, les poules pondeuses et les reproducteurs.

La mise en place d'un programme de surveillance pour tracer l'émergence de souches d'*E. coli* virulentes et résistantes aux antibiotiques dans les élevages de volailles est obligatoire. En outre, des efforts sont nécessaires pour surveiller la propagation des bactéries parmi les animaux et leur environnement afin d'éviter une éventuelle transmission zoonotique à l'homme.

En perspective, il serait intéressant de :

- Etudier sur le plan moléculaire le plasmide ColV, afin d'identifier les gènes qui lui sont associés

- Elargir le pool des gènes de virulence, afin d'apporter une meilleure caractérisation du profil de virulence des souches en Algérie.
- Caractériser les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques et rechercher une éventuelle association entre la virulence et la résistance aux antibiotiques.
- Caractériser les facteurs impliqués dans la formation de biofilms

RECOMMANDATIONS

Alors que l'industrie s'oriente vers une utilisation réduite des antimicrobiens, leur utilisation responsable chez la volaille doit continuer à être un élément important d'un programme efficace de contrôle de la résistance aux antimicrobiens, en particulier lorsque la co-sélection de la résistance à des antibiotiques d'importance critique peut se produire.

Des mesures doivent être prises pour éviter la diffusion et la propagation de souches pathogènes et résistantes à un large éventail d'antimicrobiens, parmi eux, des antibiotiques critiques pour la médecine humaine, et dont les conséquences seront l'apparition de zoonoses et de toxi-infections alimentaires. Ces mesures concernent :

- De vastes campagnes de sensibilisation

Il faut arriver à établir une prise de conscience générale quant à la résistance aux antibiotiques et ce, dans tous les secteurs afin de réduire la prescription des antibiotiques lorsqu'ils ne sont pas nécessaires.

Il faudrait que les décideurs politiques veillent à ce que les politiques de lutte contre la résistance aux antibiotiques soient mises en œuvre dès maintenant.

- Amélioration de l'hygiène

L'assainissement et l'amélioration de l'hygiène sont la première barrière permettant de limiter le développement de maladies infectieuses, et par conséquent le recours aux antibiotiques.

- Promotion des outils de diagnostic rapide

Il serait important de développer des diagnostics rapides et peu coûteux, ceci aura comme retour une diminution de l'utilisation des antibiotiques.

- Utilisation de vaccins et les traitements alternatifs

Le développement des vaccins et d'autovaccins constitue un outil prometteur pour prévenir le développement des infections. D'autres approches alternatives

devraient être largement disponibles sur le marché dont le but sera de traiter de manière efficace ou de prévenir les infections.

- promotion l'investissement dans les nouveaux médicaments

Il faudrait trouver des moyens pour mieux récompenser l'investissement des entreprises dans la recherche de nouvelles molécules.

APPENDICE A
FICHE DE RENSEIGNEMENT DES PRELEVEMENTS

Numéro de cas* :

Nom du vétérinaire traitant (établissement)* :

Date* :

Lieu de l'élevage* :

Type d'élevage* :

Age* :

Race :

Type de bâtiment :

Effectif :

Pourcentage de mortalité :

Lésions observées :

APPENDICE B LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APEC : Avian Pathogenic *Escherichia coli*

ARN : Acide ribonucléique

BGN : bacille à Gram négatif

BLSE : β -lactamase à Spectre Elargi

CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DO : densité optique

E.coli : *Escherichia coli*

ExPEC : Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*

I β L : Inhibiteur des β -lactamases

LDC : Lysine Décarboxylase

LPS : lipopolysaccharide

Mcr : mediated-colistin resistance

MDR : multidrug resistance

Min : Minutes

ODC : Ornithine Décarboxylase

OMP : Outer Membrane Protéin

ONPG : Orthonitrophényl- β -Galactoside

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLP : Protéine liant les pénicillines

PMQR : Plasmid-mediated Quinolone Resistance

QS : quorum sensing

TDA : Tryptophane désaminase

UPEC : Urogenic Pathogenic *Escherichia coli*

VP : Voges-Proskauer

APPENDICE C

LISTE DU MATERIEL DE LABORATOIRE

Matériel non biologique

- Anse de platine
- Autoclave
- Bain-Marie
- Bec bensun
- Boîtes de Pétri stériles
- Centrifugeuse
- Ciseaux
- Cuve d'électrophorèse
- Ecouvillons
- Etuve à 35°C
- Lame et lamelles
- Lecteur gel d'agarose
- Microscope optique
- Nanodrop
- Pinces métalliques
- Pipettes Pasteur
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre
- Thermocycleur
- Tubes à essai

Matériel biologique

Escherichia coli ATCC 25922, utilisée pour le contrôle de qualité

Milieux de culture

- BHIB : bouillon coeur-cerveau. Pour 1 litre de milieu :
- Gélose nutritive
- Gélose Hektoen
- Gélose Muller-Hinton

- Bouillon Mueller-Hinton

Solutions et réactifs

Eau physiologique stérile,

Réactif de Kovacs,

Colistine sulfate

Réactif TDA,

Réactif VP 1 et VP 2.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kaci, A. , "La filière avicole algérienne à l'ère de la libéralisation économique," Cahiers Agricultures. (2015), V. 24, n° 3, 151–160.
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," Journal of Clinical Microbiology. (2012), V. 50, n° 5, 1673–1678.
3. Dho-moulin, M. and Fairbrother, J. M. , "Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)," Veterinary research. (1999), V. 30, n° 2–3, 299–316.
4. Oliveira, A. L. De , Rocha, D. A. , Finkler, F. , Moraes, L. B. De , Barbieri, N. L. , Pavanelo, D. B. , Winkler, C. , Grassotti, T. T. , Brito, K. C. T. De , Brito, B. G. De , and Horn, F. , "Prevalence of ColV Plasmid-Linked Genes and in Vivo Pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*," Foodborne Pathogens and Disease. (2015), V. 12, n° 8, 679–685.
5. Mellata, M. , "Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends," Foodborne Pathogens and Disease. (2013), V. 10, n° 11, 916–932.
6. Cordoni, G. , Woodward, M. J. , Wu, H. , Alanazi, M. , Wallis, T. , and Ragione, R. M. La , "Comparative genomics of European avian pathogenic *E. coli* (APEC)," BMC Genomics. (2016), V. 17, n° 1, 1–21.
7. 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," Journal of Clinical Microbiology. (2008), V. 46, n° 12, 3987–3996.
8. Mellata, M. , Dho-Moulin, M. , Dozois, C. M. , Curtiss, R. , Brown, P. K. , Arné, P. , Brée, A. , Desautels, C. , and Fairbrother, J. M. , "Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity," Infection and Immunity. (2003), V. 71, n° 1, 536–540.

9. 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 chickens in Spain," Journal of Clinical Microbiology. (1997), V. 35, n° 8, 2184–2185.
10. Hoelzer, K. , Wong, N. , Thomas, J. , Talkington, K. , Jungman, E. , and Coukell, A. , "Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence?," BMC Veterinary Research. (2017), V. 13, n° 1, 211.
11. Mainil, J. , "*Escherichia coli* virulence factors," Veterinary Immunology and Immunopathology. (2013), V. 152, n° 1–2, 2–12.
12. Avril J.L., Dbernat H., Denis f., M. H. Bactériologie clinique. Paris 1992.
13. Kaper, J. B. , Nataro, J. P. , and Mobley, H. L. T. , "Pathogenic *Escherichia coli*," Nature Reviews Microbiology. (2004), V. 2, n° 2, 123–140.
14. Stenutz, R. , Weintraub, A. , and Widmalm, G. , "The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens," FEMS Microbiology Reviews. (2006), V. 30, n° 3, 382–403.
15. Batchelor, R. A. , Alifano, P. , Biffali, E. , Hull, S. I. , and Hull, R. A. , "Nucleotide sequences of the genes regulating O-polysaccharide antigen chain length (rol) from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Protein homology and functional complementation," Journal of Bacteriology. (1992), V. 174, n° 16, 5228–5236.
16. Orskov, I. , Orskov, F. , Jann, B. , and Jann, K. , "Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*," Bacteriological Reviews. (1977), V. 41, n° 3, 667–710.
17. Orskov, I. orskov F. , "*Escherichia coli* in extra-intestinal infections," (1985), n° 1985, 551–575.
18. 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 Diseases. (2005), V. 49, n° 2, 269–273.

19. Bélanger, L. , Gareaux, A. , Harel, J. , Boulianne, M. , Nadeau, E. , and Dozois, C. M. , “Escherichia colifrom animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*,” FEMS Immunology and Medical Microbiology. (2011), V. 62, n° 1, 1–10.
20. Russo, T. A. and Johnson, J. R. , “Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC,” Journal of Infectious Diseases. (2000), V. 181, n° 5, 1753–1754.
21. Russo, T. A. and Johnson, J. R. , “Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem,” Microbes and Infection. (2003), V. 5, n° 5, 449–456.
22. Nolan, L. K.; Barnes, H. J.; Vaillancourt, J.; Abdul-aziz, T.; and Logue, C. M. Colibacillose. *In Diseases of Poultry*; John Wiley & Sons, (2013); 751–805.
23. Stordeur, P. , Beaupain, N. , and Mainil, J. , “Caractérisation génotypique de souches invasives aviaires d’*Escherichia coli* isolées en Belgique,” Annales de Medecine Veterinaire. (2003), V. 147, n° 4, 275–280.
24. Lutful Kabir, S. M. , “Avian colibacillose and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns,” International Journal of Environmental Research and Public Health. (2010), V. 7, n° 1, 89–114.
25. Gross, W. B. , “The Development of ‘Air Sac Disease,’” Avian Diseases. (1961), V. 5, n° 4, 431.
26. Gross, W. B. , “Factors affecting the development of respiratory disease complex in chickens.,” Avian diseases. (1990), V. 34, n° 3, 607–610.
27. Rodriguez-Siek, K. E. , Giddings, C. W. , Doetkott, C. , Timothy J. Johnson, T. J. , and Nolan, L. K. , “Characterizing the APEC pathotype,” Veterinary research. (2005), V. 36, 241–256.
28. Nakamura, K. , Maeda, M. , Imada, Y. , Imada, T. , and Sato, K. , “Pathology of spontaneous colibacillose in a broiler flock.,” Veterinary pathology. (1985), V. 22, n° 6, 592–597.
29. 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," Veterinary Microbiology. (2004), V. 104, n° 1–2, 91–101.

30. Barnes, J. H.; Nolan, L. K.; and Vaillancourt, J.-P. Colibacillosis. In *Diseases of Poultry*; (2008), 691–737.
31. Bisgaard, M. and Dam, A. , "Salpingitis in poultry. II. Prevalence, bacteriology, and possible pathogenesis in egg-laying chickens.,," Nordisk Veterinaermedicin. (1981), V. 33, n° 2, 81–89.
32. 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. (2008), V. 37, n° 4, 355–366.
33. Nakamura, K. , Mase, M. , Tanimura, N. , Yamaguchi, S. , Nakazawa, M. , and Yuasa, N. , "Swollen head syndrome in broiler chickens in Japan: Its pathology, microbiology and biochemistry," Avian Pathology. (1997), V. 26, n° 1, 139–154.
34. Gomis, S. , Amoako, K. , Ngeleka, M. , Belanger, L. , Althouse, B. , Kumor, L. , Waters, E. , Stephens, S. , Riddell, C. , Potter, A. , and Allan, B. , "Histopathologic and bacteriologic evaluations of cellulitis detected in legs and caudal abdominal regions of turkeys," Avian Diseases. (2002), V. 46, n° 1, 192–197.
35. Joya, J. E. , Tsuji, T. , Jacalne, A. V. , Arita, M. , Sukamoto, T. , Honda, T. , and Miwatani, T. , "Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks," European Journal of Epidemiology. (1990), V. 6, n° 1, 88–90.
36. Pourbakhsh, S. A. , Dho-Moulin, M. , Brée, A. , Desautels, C. , Martineau-Doize, B. éatrice , and Fairbrother, J. M. , "Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*," Microbial Pathogenesis. (1997), V. 22, n° 6, 331–341.
37. Katiyar, A. K. , Vegad, J. L. , and Awadhiya, R. P. , "Increased vascular permeability and leucocyte emigration in *Escherichia coli* endotoxin injury in the chicken skin," Research in Veterinary Science. (1992), V. 52, n° 2, 154–161.

38. Harmon, B. G. , "Avian Heterophils in Inflammation and Disease Resistance," Poultry Science. (1998), V. 77, n° 7, 972–977.
39. Sarowska, J. , Futoma-Koloch, B. , Jama-Kmiecik, A. , Frej-Madrzak, M. , Ksiazczyk, M. , Bugla-Ploskonska, G. , and Choroszy-Krol, I. , "Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports," Gut Pathogens. (2019), V. 11, n° 1, 1–16.
40. Mainil, J. , "Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: II). Franchissement des muqueuses et propriétés invasives," Annales de Medecine Veterinaire. (2003), V. 147, n° 3, 159–171.
41. Krogfelt, K. A. , Bergmans, H. , and Klemm, P. , "Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae," Infection and Immunity. (1990), V. 58, n° 6, 1995–1998.
42. Dozois, C. , Chanteloup, N. , Dho-Moulin, M. , Brée, A. , Desautels, C. , and Fairbrother, J. , "Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*," Avian Dis. (1994), V. 38, n° 2, 231–239.
43. Pourbakhsh, S. A. , Boulian, M. , Martineau-Doizé, B. , and Fairbrother, J. M. , "Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens," Veterinary Microbiology. (1997), V. 58, n° 2–4, 195–213.
44. Marc, D. , Arné, P. , Brée, A. , and Dho-Moulin, M. , "Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*," Research in Microbiology. (1998), V. 149, n° 7, 473–485.
45. Arné, P. , Marc, D. , Brée, A. , Schouler, C. , and Dho-Moulin, M. , "Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion," Avian Diseases. (2000), V. 44, n° 2, 343–355.
46. Stordeur, P. , Marlier, D. , Blanco, J. , Oswald, E. , Biet, F. , Dho-Moulin, M. , and Mainil, J. , "Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic E. coli," Veterinary Microbiology. (2002), V. 84, n° 3, 231–241.

47. Babai, R. , Stern, B. E. , Hacker, J. , and Ron, E. Z. , "New fimbrial gene cluster of S-fimbrial adhesin family," *Infection and Immunity.* (2000), V. 68, n° 10, 5901–5907.
48. Yerushalmi, Z. , Smorodinsky, N. I. , Naveh, M. , and Ron, E. Z. , "Adherence Pili of Avian Strains of *Escherichia coli* 078," *Infection and Immunity.* (1990), V. 58, n° 4, 1129–1131.
49. 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 Diseases.* (1998), V. 42, n° 1, 106–118.
50. Ragione, R. M. La , 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 Microbiology Letters.* (1999), V. 175, n° 2, 247–253.
51. Aguero, M. E. , Aron, L. , Deluca, A. G. , Timmis, K. N. , and Cabello, F. C. , "A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis," *Infection and Immunity.* (1984), V. 46, n° 3, 740–746.
52. Binns, M. , Davies, D. , and Hardy, K. , "Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance.," *Nature Reviews Microbiology.* (1979), V. 279, n° 5716, 778–781.
53. Tivendale, K. A. , Allen, J. L. , Ginns, C. A. , Crabb, B. S. , and Browning, G. F. , "Association of iss and iucA, but not tsh, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*," *Infection and Immunity.* (2004), V. 72, n° 11, 6554–6560.
54. Jann, K. and Jann, B. , "Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance," *canadian journal of microbiology.* (1992), V. 38, n° 7, 705–710.
55. Kathayat, D. , Lokesh, D. , Ranjit, S. , and Rajashekara, G. , "Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors , Zoonotic Potential , and Control Strategies," *Pathogens.* (2021), V. 10, n°

467, 1–32.

56. Andrews, S. C. , Robinson, A. K. , and Rodríguez-Quiñones, F. , “Bacterial iron homeostasis,” *FEMS Microbiology Reviews*. (2003), V. 27, n° 2–3, 215–237.
57. Kronstad, J. W. and Caza, M. , “Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. (2013), V. 4, n° NOV, 1–23.
58. Bäumler, A. J. , Norris, T. L. , Lasco, T. , Voigt, W. , Reissbrodt, R. , Rabsch, W. , and Heffron, F. , “IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*,” *Journal of Bacteriology*. (1998), V. 180, n° 6, 1446–1453.
59. Dho-Moulin, M. and Lafont, J. , “Adhesive Properties and Iron Uptake Ability in *Escherichia coli* Lethal and Nonlethal for Chicks,” *Avian Diseases*. (1984), V. 28, n° 4, 1016–1025.
60. 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,” *International Journal of Medical Microbiology*. (2001), V. 291, n° 5, 371–378.
61. 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,” *Journal of Bacteriology*. (2006), V. 188, n° 2, 745–758.
62. Sabri, M. , Léveillé, 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*. (2006), V. 152, n° 3, 745–758.
63. Parreira, V. R. and Gyles, C. L. , “Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*,” *Veterinary Microbiology*. (2002), V. 87, n° 4, 341–352.
64. Johnson, T. J. and Nolan, L. K. , “Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (2009), V. 73, n° 4, 750–774.

65. Murase, K. , Martin, P. , Porcheron, G. , Houle, S. , Helloin, E. , Pénary, M. , Nougayrède, J. P. , Dozois, C. M. , Hayashi, T. , and Oswald, E. , "HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis," *Journal of Infectious Diseases.* (2015), V. 212, n° 11, 856–865.
66. Henderson, I. R. , Navarro-Garcia, F. , Desvaux, M. , Fernandez, R. C. , and Ala'Aldeen, D. , "Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story," *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* (2004), V. 68, n° 4, 692–744.
67. Cascales, E. , Buchanan, S. K. , Duché, D. , Kleanthous, C. , Lloubès, R. , Postle, K. , Riley, M. , Slatin, S. , and Cavard, D. , "Colicin Biology," *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* (2007), V. 71, n° 1, 158–229.
68. Skyberg, J. A. , Johnson, T. J. , and Nolan, L. K. , "Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid," *BMC Microbiology.* (2008), V. 8, 1–8.
69. Kim, K. S. , "*Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier," *Infection and Immunity.* (2001), V. 69, n° 9, 5217–5222.
70. Germon, P. , Chen, Y. H. , He, L. , Blanco, J. E. , Brée, A. , Schouler, C. , Huang, S. H. , and Moulin-Schouleur, M. , "IbeA, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*," *Microbiology.* (2005), V. 151, n° 4, 1179–1186.
71. Deb, J.R. and Harry, E.G. Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (O2:K1) infection in fowls. *Research in Veterinary Science.* (1978), V. 24, n° 3 , 308–313.
72. Abdul-Aziz, T. A. and El-Sukhon, S. N. , "Chickens hyperimmunized with *Escherichia coli* J5 strain are protected against experimental challenge with *Escherichia coli* O78 serotype," *Veterinary Research Communications.* (1998), V. 22, n° 1, 7–9.
73. Kwaga, J. K. P. , Allan, B. J. , Hurk, J. V. Van den , Seida, H. , and Potter, A. A. , "A carAB mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in Turkeys," *Infection and Immunity.* (1994), V. 62, n° 9, 3766–3772.

74. Roland, K. , Curtiss, R. 3r. , and Sizemore, D. , "Construction and evaluation of a delta cya delta crp *Salmonella typhimurium* strain expressing avian pathogenic *Escherichia coli* O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens," *Avian Diseases*. (1999), V. 43, n° 3, 429–441.
75. Heller, E. D. , Leitner, G. , Drabkin, N. , and Melamed, D. , "Passive immunisation of chicks against *Escherichia coli*," *Avian Pathology*. (1990), V. 19, n° 2, 345–354.
76. Gomis, S. , Babiuk, L. , Godson, D. L. , Allan, B. , Thrush, T. , Townsend, H. , Willson, P. , Waters, E. , Hecker, R. , and Potter, A. , "Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs," *Infection and Immunity*. (2003), V. 71, n° 2, 857–863.
77. Guardabassi, L. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*.; Aarestrup, F. M., Ed.; Washington (D.C.): ASM press, 2006; pp. 1–18.
78. Bambeke François, T. P. Van , "Pharmacologie et Pharmacothérapie anti-infectieuse," Syllabus national belge de pharmacologie- Pharmacologie et Pharmacothérapie. (2010), 204.
79. Perry, J. A. , Westman, E. L. , and Wright, G. D. , "The antibiotic resistome: What's new?," *Current Opinion in Microbiology*. (2014), V. 21, 45–50.
80. Guillemot, D. , "Usages vétérinaires des antibiotiques , résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine," Afssa. (2006), 232.
81. Bogaard, A. E. Van Den and Stobberingh, E. E. , "Antibiotic usage in animals. Impact on bacterial resistance and public health," *Drugs*. (1999), V. 58, n° 4, 589–607.
82. Bywater, R. J. , "Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production," *Poultry Science*. (2005), V. 84, n° 4, 644–648.
83. Dibner, J. J. and Richards, J. D. , "Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action," *Poultry Science*. (2005), V. 84, n° 4, 634–643.
84. Sanders, P. , "L'antibiorésistance en médecine vétérinaire: enjeux de santé publique et de santé animale," bulletin académie française. (2005), n° 1, 137–143.

85. Harbottle, H. , Thakur, S. , Zhao, S. , and White, D. G. , "Genetics of antimicrobial resistance," *Animal Biotechnology*. (2006), V. 17, n° 2, 111–124.
86. McDermott, P. F. , Walker, R. D. , and White, D. G. , "Antimicrobials: Modes of action and mechanisms of resistance," *International Journal of Toxicology*. (2003), V. 22, n° 2, 135–143.
87. Boerlin, P. and White, D. G. *Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology*. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*; Giguère, S., Prescott, J. F., Dowling, P. M., Eds.; (2013) , 21–40.
88. Seiffert, S. N. , Hilty, M. , Perreten, V. , and Endimiani, A. , "Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health?," *Drug Resistance Updates*. (2013), V. 16, n° 1–2, 22–45.
89. Li, X. Z. , Mehrotra, M. , Ghimire, S. , and Adewoye, L. , "β-Lactam resistance and β-lactamases in bacteria of animal origin," *Veterinary Microbiology*. (2007), V. 121, n° 3–4, 197–214.
90. Bush, K. , "Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes," (2012), V. 31, n° 1, 43–56.
91. Cavallo, J. , Fabre, R. , Jehl, F. , Rapp, C. , and Garrabé, E. , "Beta-lactam antibiotics," *EMC maladies infectieuses*; Elsevier. (2004), V. 1, 129–202.
92. Livermore, D. M. , "B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance," *Clinical Microbiology Reviews*. (1995), V. 8, n° 4, 557–584.
93. Poole, K. , "Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms," *Annals of Medicine*. (2007), V. 39, n° 3, 162–176.
94. Abraham, E. P. and Chain, E. , "An Enzyme from Bacteria able to," *Nature*. (1940), V. 146, 837.
95. Davies, J. , "Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes.," *Science*. (1994), V. 264, 375–382.
96. Ambler, R. . , "The structure of B-lactamases," *philos trans. R. Soc. London*. (1980), V. B289, n° 1036, 321–333.

97. Bush, K. and Jacoby, G. A. , "Updated functional classification of β -lactamases," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2010), V. 54, n° 3, 969–976.
98. Bradford, P. and Allen, D. , "Extended-Spectrum -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat," *Clinical Microbiology Reviews*. (2001), V. 14, n° 4, 933–951.
99. Caroff, N. , Espaze, E. , Gautreau, D. , Richet, H. , and Reynaud, A. , "Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (2000), V. 45, n° 6, 783–788.
100. Bailey, J. K. , Pinyon, J. L. , Anantham, S. , and Hall, R. M. , "Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (2011), V. 66, n° 4, 745–751.
101. Cantón, R. , Novais, A. , Valverde, A. , Machado, E. , Peixe, L. , Baquero, F. , and Coque, T. M. , "Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe," *Clinical Microbiology and Infection*. (2008), V. 14, n° SUPPL. 1, 144–153.
102. Bonnet, R. , "Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2004), V. 48, n° 1, 1–14.
103. Cantón, R. and Coque, T. M. , "The CTX-M β -lactamase pandemic," *Current Opinion in Microbiology*. (2006), V. 9, n° 5, 466–475.
104. Philippon, A. , Arlet, G. , Iorga, B. , Philippon, A. , Arlet, G. , Iorga, B. , and De, B. B. , "Bêta-lactamases BLSE de type CTX-M," *bulletin de l'académie vétérinaire de France*. (2022), V. 175, n° hal-04230554, 256–265.
105. Philippon, A. , Arlet, G. , and Jacoby, G. A. , "Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2002), V. 46, n° 1, 1–11.
106. Bush, K. , "Metallo- β -Lactamases: A Class Apart," *clinical infectious disease*. (1998), V. 27, n° Suppl 1, 48–53.

107. Castillo, J. . Tetracyclines. *In Antimicrobial Therapy in Veterinary Medecine*; Giguere, S., Prescott, J., Dowling, P., Eds.; Wiley and sons, (2013), 257–268.
108. Paulsen, I. T. , Brown, M. H. , and Skurray, R. A. , “Proton-dependent multidrug efflux systems,” *Microbiological Reviews*. (1996), V. 60, n° 4, 575–608.
109. Grossman, T. H. , “Tetracycline antibiotics and resistance,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. (2016), V. 6, n° 4, 1–24.
110. Connell, S. R. , Tracz, D. M. , Nierhaus, K. H. , and Taylor, D. E. , “Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2003), V. 47, n° 12, 3675–3681.
111. Chopra, I. and Roberts, M. , “Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (2001), V. 65, n° 2, 232–260.
112. Armstrong, E. .; Kostrub, C. F.; Cass, R. T.; Moser, H. E.; Serio, A. W.; and Miller, G. H. Aminoglycosides. *In Antibiotic Discovery and Development*; Dougherty, T. J., Pucci, M. J., Eds.; Springer science media, (2012), 229–269.
113. Garneau-Tsodikova, S. and Labby, K. J. , “Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives,” *medchemcomm*. (2016), V. 7, n° 1, 11–27.
114. Zarubica, T. , Baker, M. R. , Wright, H. T. , and Rife, J. P. , “The aminoglycoside resistance methyltransferases from the ArmA/Rmt family operate late in the 30S ribosomal biogenesis pathway,” *Rna*. (2011), V. 17, n° 2, 346–355.
115. Hooper, D. C. and A., J. G. , “Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance,” *Physiology & behavior*. (2017), V. 176, n° 3, 139–148.
116. Redgrave, L. S. , Sutton, S. B. , Webber, M. A. , and Piddock, L. J. V. , “Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success,” *Trends in Microbiology*. (2014), V. 22, n° 8, 438–445.
117. Bambeke, F. Van; Glupczynski, Y.; Mingeot-Leclercq, M.-P.; and Tulkens, P. M. Mechanisms of Action. *In Infectous Diseases*; Cohen, J., Powderly, W., Opal, S., Eds.; Elsevier, (2010), 1288–1307.

118. Guillard, T. and Cambau, E. , “Une brève histoire des résistances plasmidiques aux quinolones,” *Journal des Anti-Infectieux*. (2012), V. 15, n° 1, 1–8.
119. Rosenberg, E. Y. , Bertenthal, D. , Nilles, M. L. , Bertrand, K. P. , and Nikaido, H. , “Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein,” *Molecular Microbiology*. (2003), V. 48, n° 6, 1609–1619.
120. Jacoby, G. A. . and Hooper, D. C. Review of the Quinolone Family. *In Antibiotic Discovery and Development*; Dougherty, T. J., Pucci, M. J., Eds.: Springer, (2011), 119–145.
121. Yamane, K. , Wachino, J. I. , Suzuki, S. , and Arakawa, Y. , “Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2008), V. 52, n° 4, 1564–1566.
122. Sköld, O. , “Sulfonamides and trimethoprim,” *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. (2010), V. 8, n° 1, 1–6.
123. Prescott, W. and Sherwood, W. *Microbiologie - 4ème édition*. (2013).
124. Huovinen, P. , “Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole,” *antimicrobial resistance*. (2001), V. 32, 1608–1614.
125. Domínguez, M. , Miranda, C. D. , Fuentes, O. , Fuente, M. De , Llewellyn, M. S. , and Miranda, C. D. , “Occurrence of Transferable Integrons and sul and dfr Genes Among Sulfonamide-and / or Trimethoprim-Resistant Bacteria Isolated From Chilean Salmonid Farms,” *Frontiers in Microbiology*. (2019), V. 10, n° April, 1–14.
126. Biswas, S. , Brunel, J. M. , Dubus, J. C. , Reynaud-Gaubert, M. , and Rolain, J. M. , “Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century,” *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. (2012), V. 10, n° 8, 917–934.
127. Falagas, M. E. and Kasiakou, S. K. , “Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections,” *Clinical Infectious Diseases*. (2005), V. 40, n° 9, 1333–1341.
128. 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. (2013), V. 42, n° 5, 379–383.
129. Baron, S. , Hadjadj, L. , Rolain, J. M. , and Olaitan, A. O. , "Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns," International Journal of Antimicrobial Agents. (2016), V. 48, n° 6, 583–591.
130. Olaitan, A. O. , Morand, S. , and Rolain, J. M. , "Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria," Frontiers in Microbiology. (2014), V. 5, n° NOV, 1–18.
131. Gogry, F. A. , Siddiqui, M. T. , Sultan, I. , and Haq, Q. M. R. , "Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria," Frontiers in Medicine. (2021), V. 8, n° August, 1–19.
132. Liu, Y. Y. , Wang, Y. , Walsh, T. R. , Yi, L. X. , Zhang, R. , Spencer, J. , Doi, Y. , Tian, G. , Dong, B. , Huang, X. , Yu, L. F. , Gu, D. , Ren, H. , Chen, X. , Lv, L. , He, D. , Zhou, H. , Liang, Z. , Liu, J. H. , and Shen, J. , "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study," The Lancet Infectious Diseases. (2016), V. 16, n° 2, 161–168.
133. Li, R. , Xie, M. , Zhang, J. , Yang, Z. , Liu, L. , Liu, X. , Zheng, Z. , Chan, E. W. C. , and Chen, S. , "Genetic characterization of mcr-1-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant," Journal of Antimicrobial Chemotherapy. (2017), V. 72, n° 2, 393–401.
134. Lambert, T. , "Antibiotics that affect the ribosome," OIE Revue Scientifique et Technique. (2012), V. 31, n° 1, 57–64.
135. CLSI clinical laboratory standards institute 28th edition M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. (2018).
136. Magiorakos, A. , Srinivasan, A. , Carey, R. B. , Carmeli, Y. , Falagas, M. E. , Giske, C. G. , Harbarth, S. , and Hindler, J. F. , "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance," Clin Microbiol Infect. (2012),

V. 18, n° 3, 268–281.

137. EUCAST , “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022.,” (2022), V. 12.0, 1–110.
138. CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, supplement M100. (2020).
139. Simner, P. J. , Bergman, Y. , Trejo, M. , Roberts, A. A. , Marayan, R. , Tekle, T. , Campeau, S. , Kazmi, A. Q. , Bell, D. T. , Lewis, S. , Tamma, P. D. , Humphries, R. M. , and Hindler, J. A. , “Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Bacilli,” Journal of Clinical Microbiology. (2019), V. 57, n° 2, 1–7.
140. Dilhari, A. , Sampath, A. , Gunasekara, C. , Fernando, N. , Weerasekara, D. , Sissons, C. , McBain, A. , and Weerasekera, M. , “Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method,” AMB Express. (2017), V. 7, n° 1, 179.
141. Rebelo, A. R. , Bortolaia, V. , Kjeldgaard, J. S. , Pedersen, S. K. , Leekitcharoenphon, P. , Hansen, I. M. , Guerra, B. , Malorny, B. , Borowiak, M. , Hammerl, J. A. , Battisti, A. , Franco, A. , Alba, P. , Perrin-Guyomard, A. , Granier, S. A. , Frutos, C. de , Escobar , Malhotra-Kumar, S. , Villa, L. , Carattoli, A. , and Hendriksen, R. S. , “Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes,” Eurosurveillance. (2018), V. 23, n° 6, 17–00672.
142. Berkhoff, H. A. and Vinal, A. C. , “Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry.,” Avian diseases. (1986), V. 30, n° 1, 117–121.
143. Fierer, J. , Finley, F. , and Braude, A. , “A plaque assay on agar for detection of gram-negative bacilli sensitive to complement,” journal of immunology. (1972), V. 109, n° 5, 1156–1158.
144. Christensen, G. D. , Simpson, W. A. , Younger, J. J. , Baddour, L. M. , Barrett, F. F. , Melton, D. M. , and Beachey, E. H. , “Adherence of coagulase-

negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices," Journal of Clinical Microbiology. (1985), V. 22, n° 6, 996–1006.

145. Stepanović, S. , Ćirković, I. , Ranin, L. , and Švabić-Vlahović, M. , "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface," Letters in Applied Microbiology. (2004), V. 38, n° 5, 428–432.
146. Al-Kandari, F. and Woodward, M. J. , "Genotypic and phenotypic diversity differences of presumptive commensal and avian pathogenic *E. coli*," British Poultry Science. (2019), V. 60, n° 1, 79–86.
147. Johnson, J. R. and Stell, A. L. , "Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise," Journal of Infectious Diseases. (2000), V. 181, n° 1, 261–272.
148. Manges, A. R. , "*Escherichia coli* and urinary tract infections: The role of poultry-meat," Clinical Microbiology and Infection. (2016), V. 22, n° 2, 122–129.
149. Radwan, I. A.-E. , Sayed, H. , Salam, H. , and Abd-alwanis, S. A. A. , "Frequency of some virulence associated genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from septicemic broiler chicken," International Journal of Advanced Research. (2014), V. 2, n° 12, 867–874.
150. Messai, C. R. , Ait Oudhia, K. , Khelef, D. , Hamdi, T. M. , Chenouf, N. S. , and MMessai, M. R. , "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. (2015), V. 9, n° 49, 2358–2363.
151. Aggad, H. , Ahmed Ammar, Y. , Hammoudi, A. , and Kihal, M. , "Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis," Global Veterinaria. (2010), V. 4, n° 3, 303–306.
152. FAO , "Plan d'action de la FAO contre la résistance aux antimicrobiens 2021-2025.". (2021)
153. Meguenni, N. , Chanteloup, N. , Trottereau, A. , Ahmed, C. A. , Bounar-Kechih, S. , and Schouler, C. , "Virulence and antibiotic resistance profile of avian

"*Escherichia coli* strains isolated from colibacillosis lesions in central of Algeria," Veterinary World. (2019), V. 12, n° 11, 1840–1848.

154. Mohamed, L. , Ge, Z. , Yuehua, L. , Yubin, G. , Rachid, K. , Mustapha, O. , Junwei, W. , and Karine, O. , "Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria," Tropical Animal Health and Production. (2018), V. 50, n° 3, 547–553.
155. Rahmatallah, N. , Nassik, S. , Rhaffouli, H. E. L. , Amine, I. L. , and Houadfi, M. E. L. , "Détection de souches multi-résistantes d ' *Escherichia coli* d'origine aviaire dans la région de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer.," Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. (2016), V. 1, n° June, 96–102.
156. Afayibo, D. J. A. , Zhu, H. , Zhang, B. , Yao, L. , Abdelgawad, H. A. , Tian, M. , Qi, J. , Liu, Y. , and Wang, S. , "Isolation, Molecular Characterization, and Antibiotic Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Eastern China," Veterinary Sciences. (2022), V. 9, n° 7, 1–11.
157. Varga, C. , Brash, M. L. , Slavic, D. , Boerlin, P. , Ouckama, R. , Weis, A. , Petrik, M. , Philippe, C. , Barham, M. , and Guerin, M. T. , "Evaluating Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Broiler and Broiler Breeder Chickens in Ontario, Canada," Avian Diseases. (2018), V. 62, n° 3, 291–299.
158. Meguenni, N. , Devendec, L. Le , Jouy, E. , Corvec, M. Le , Bounar-Kechih, S. , Bakour, R. , and Kempf, I. , "First description of an extended-spectrum cephalosporin-and fluoroquinolone-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* clone in algeria," Avian Diseases. (2015), V. 59, n° 1, 20–23.
159. Laarem, M. , Barguigua, A. , Nayme, K. , Akila, A. , Zerouali, K. , Mdaghri, N. El , and Timinouni, M. , "Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria," Journal of Infection in Developing Countries. (2017), V. 11, n° 2, 143–151.
160. Messaili, C. , Messai, Y. , and Bakour, R. , "Virulence gene profiles, antimicrobial resistance and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens in algeria," Veterinaria Italiana. (2019), V. 55, n° 1, 35–46.

161. Marshall, B. M. and Levy, S. B. , "Food animals and antimicrobials: Impacts on human health," *Clinical Microbiology Reviews*. (2011), V. 24, n° 4, 718–733.
162. Moniri, R. and Dastehgoli, K. , "Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy broilers with previous exposure to fluoroquinolones: Is there a link?," *Microbial Ecology in Health and Disease*. (2005), V. 17, n° 2, 69–74.
163. Subedi, M. , Luitel, H. , Devkota, B. , Bhattacharai, R. K. , Phuyal, S. , Panthi, P. , Shrestha, A. , and Chaudhary, D. K. , "Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal," *BMC Veterinary Research*. (2018), V. 14, n° 1, 4–9.
164. 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*. (2017), V. 10, n° 7, 830–835.
165. Dhaouadi, S. , Soufi, L. , Hamza, A. , Fedida, D. , Zied, C. , Awadhi, E. , Mtibaa, M. , Hassen, B. , Cherif, A. , Torres, C. , Abbassi, M. S. , and Landolsi, R. B. , "Co-occurrence of mcr-1 mediated colistin resistance and β-lactamase-encoding genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis in Tunisia," *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. (2020), V. 22, 538–545.
166. Dandachi, I. , Chabou, S. , Daoud, Z. , and Rolain, J. M. , "Prevalence and emergence of extended-spectrum cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant gram negative bacteria of animal origin in the Mediterranean basin," *Frontiers in Microbiology*. (2018), V. 9, n° september, 2299.
167. Barbieri, N. L. , Nielsen, D. W. , Wannemuehler, Y. , Cavender, T. , Hussein, A. , Yan, S. G. , Nolan, L. K. , and Logue, C. M. , "Mcr-1 identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)," *PLoS ONE*. (2017), V. 12, n° 3, e0172997.
168. Humphries, R. M. , Green, D. A. , Schuetz, A. N. , Bergman, Y. , Lewis, S. , Yee, R. , Stump, S. , Lopez, M. , MacEsic, N. , Uhlemann, A. C. , Kohner, P. , Cole, N. , and Simner, P. J. , "Multicenter evaluation of colistin broth disk elution and colistin agar test: A report from the clinical and laboratory standards institute," *Journal of Clinical Microbiology*. (2019), V. 57, n° 11
169. Badr, H. , Samir, A. , El-Tokhi, E. I. , Shahein, M. A. , Rady, F. M. , Hakim, A.

- S. , Fouad, E. A. , El-Sady, E. F. , and Ali, S. F. , "Phenotypic and Genotypic Screening of Colistin Resistance Associated with Emerging Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Poultry," Veterinary Sciences. (2022), V. 9, n° 6, 282.
170. Mead, A. , Billon-Lotz, C. , Olsen, R. , Swift, B. , Richez, P. , Stabler, R. , and Pelligand, L. , "Epidemiological Prevalence of Phenotypical Resistances and Mobilised Colistin Resistance in Avian Commensal and Pathogenic *E. coli* from Denmark, France, The Netherlands, and the UK," Antibiotics. (2022), V. 11, n° 5
171. Wang, C. , Feng, Y. , Liu, L. , Wei, L. , Kang, M. , and Zong, Z. , "Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10," Emerging Microbes and Infections. (2020), V. 9, n° 1, 508–516.
172. Chabou, S. , Leangapichart, T. , Okdah, L. , Page, S. Le , Hadjadj, L. , and Rolain, J. M. , "Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance," New Microbes and New Infections. (2016), V. 13, 71–74.
173. Chabou, S. , Leulmi, H. , and Rolain, J. M. , "Emergence of mcr-1-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from poultry in Algeria," Journal of Global Antimicrobial Resistance. (2019), V. 16, 115–116.
174. Loucif, L. , Chelaghma, W. , Bendjama, E. , Cherak, Z. , Khellaf, M. , Khemri, A. , and Rolain, J. M. , "Detection of blaOXA-48 and mcr-1 Genes in *Escherichia coli* Isolates from Pigeon (*Columba livia*) in Algeria," Microorganisms. (2022), V. 10, n° 5, 975.
175. Touati, M. , Hadjadj, L. , Berrazeg, M. , Baron, S. A. , and Rolain, J. M. , "Emergence of *Escherichia coli* harbouring mcr-1 and mcr-3 genes in North West Algerian farmlands," Journal of Global Antimicrobial Resistance. (2020), V. 21, 132–137.
176. Drali, R. , Berrazeg, M. , Zidouni, L. L. , Hamitouche, F. , Abbas, A. A. , Deriet, A. , and Mouffok, F. , "Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater," Science of the Total Environment. (2018), V. 642, 90–94.
177. Chelaghma, W. , Loucif, L. , Bendjama, E. , Cherak, Z. , Bendahou, M. , and

- Rolain, J. M. , "Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria," *Antibiotics*. (2022), V. 11, n° 8, 988.
178. Chaalal, N. , Touati, A. , Yahiaoui-Martinez, A. , Aissa, M. , Sotto, A. , Lavigne, J. , and Pantel, A. , "Colistin-Resistant Enterobacteriales Isolated from Chicken Meat in Western Algeria," *Microb Drug Resist.* (2021), V. 27, n° 7, 991–1002.
179. Touati, A. and Mairi, A. , "Plasmid-Determined Colistin Resistance in the North African Countries: A Systematic Review," *Microbial Drug Resistance*. (2021), V. 27, n° 1, 121–133.
180. Azam, M. , Ehsan, I. , Sajjad-ul-Rahman , Saleemi, M. K. , Javed, M. R. , and Mohsin, M. , "Detection of the colistin resistance gene mcr-1 in avian pathogenic *Escherichia coli* in Pakistan," *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. (2017), V. 11, n° 17, 152–153.
181. Amin, M. B. , Sraboni, A. S. , Hossain, M. I. , Roy, S. , Mozmader, T. A. U. , Unicomb, L. , Rousham, E. K. , and Islam, M. A. , "Occurrence and genetic characteristics of mcr-1-positive colistin-resistant *E. coli* from poultry environments in Bangladesh," *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. (2020), V. 22, 546–552.
182. Lim, S. K. , Kang, H. Y. , Lee, K. , Moon, D. C. , Lee, H. S. , and Jung, S. C. , "First detection of the mcr-1 gene in *Escherichia coli* isolated from livestock between 2013 and 2015 in South Korea," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2016), V. 60, n° 11, 6991–6993.
183. Yang, Y. , Li, Y. , Song, T. , Yang, Y. , and Jiang, W. , "Colistin Resistance Gene mcr-1 and Its Variant in *Escherichia coli* Isolates from Chickens in China," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2017), V. 61, n° 5, e01204-16.
184. Kim, S. , Woo, J. H. , Kim, N. , Kim, M. H. , Kim, S. Y. , Son, J. H. , Moon, D. C. , Lim, S. K. , Shin, M. , and Lee, J. C. , "Characterization of chromosome-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from livestock in Korea," *Infection and Drug Resistance*. (2019), V. 12, 3291–3299.
185. Al-Mir, H. , Osman, M. , Drapeau, A. , Hamze, M. , Madec, J. Y. , and

- Haenni, M. , "WGS Analysis of Clonal and Plasmidic Epidemiology of Colistin-Resistance Mediated by mcr Genes in the Poultry Sector in Lebanon," *Frontiers in Microbiology*. (2021), V. 12, 624194.
186. Hadjadj, L. , Riziki, T. , Zhu, Y. , Li, J. , Diene, S. M. , and Rolain, J. M. , "Study of mcr-1 gene-mediated colistin resistance in enterobacteriaceae isolated from humans and animals in different countries," *Genes*. (2017), V. 8, n° 12, 394.
187. Barbieri, N. L. , Pimenta, R. L. , Melo, D. A. de , Nolan, L. K. , Souza, M. M. S. de , and Logue, C. M. , "Mcr-1 Identified in Fecal *Escherichia coli* and Avian Pathogenic E. coli (APEC) From Brazil," *Frontiers in Microbiology*. (2021), V. 12, 659613.
188. Adam, A. F. . , Ismaael, N. A. , Atuyahullah, T. M. . , Bentahar, E. T. , Gaidan, O. K. , and Meriz, O. M. , "Antibiotic susceptibility, serotyping and pathogenicity determination of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from colibacillosis cases in broiler chiken in Aljabel Alakhdar region, Libya," assiut veterinary medical journal. (2022), V. 68, n° 172, 1–8.
189. Cavalieri, S. J. , Bohach, G. A. , and Snyder, I. S. , "*Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity," *Microbiological Reviews*. (1984), V. 48, n° 4, 326–343.
190. Al-Saiedi, R. L. and Al-Mayah, A. A. , "Pathogenicity testing of several APEC isolates obtained from naturally infected broiler birds reared in Basrah," *international journal of poultry science*. (2014), V. 13, n° 7, 374–378.
191. Sivaranjani, M. , McCarthy, M. C. , Sniatynski, M. K. , Wu, L. , Dillon, J. A. R. , Rubin, J. E. , and White, A. P. , "Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *E. coli* Associated With Colibacillosis Outbreaks in Broiler Chickens From Saskatchewan," *Frontiers in Microbiology*. (2022), V. 13, n° June
192. Skyberg, J. A. , Siek, K. E. , Doetkott, C. , and Nolan, L. K. , "Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny," *Journal of Applied Microbiology*. (2007), V. 102, n° 2, 548–554.
193. Park, N. H. , Lee, S. J. , Lee, E. B. , Birhanu, B. T. , and Park, S. C. , "Colistin induces resistance through biofilm formation, via increased phoQ expression, in avian pathogenic *Escherichia coli*," *Pathogens*. (2021), V. 10, n° 11

194. Ahmed, A. M. , Shimamoto, T. , and Shimamoto, T. , "Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers," International Journal of Medical Microbiology. (2013), V. 303, n° 8, 475–483.
195. Morales, C. , Lee, M. , Hofacre, C. , and Maurer, J. , "Detection of a novel virulence gene and a *Salmonella* virulence homologue among *Escherichia coli* isolated from broiler chickens.," Foodborne Pathogens and Disease. (2004), V. 1, n° 3, 160/165.
196. Stumpe, S. , Schmid, R. , Stephens, D. L. , Georgiou, G. , and Bakker, E. P. , "Identification of OmpT as the Protease That Hydrolyzes the Antimicrobial Peptide Protamine before It Enters Growing Cells of *Escherichia coli*," Journal of Bacteriology. (1998), V. 180, n° 15, 4002–4006.
197. Maturana, V. G. , Fernanda, de P. , Camila, C. , Pires, M. M. , Campos, T. A. de , Nakazato, G. , Stheling, E. G. , Logue, M. C. , Nolan, L. K. , and Wanderley, D. da S. , "Subpathotypes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Exist as Defined by their Syndromes and Virulence Traits," The Open Microbiology Journal. (2011), V. 5, n° 1, 55–64.
198. Xu, X. , Sun, Q. , and Zhao, L. , "Virulence factors and antibiotic resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* in eastern China," Journal of Veterinary Research (Poland). (2019), V. 63, n° 3, 317–320.
199. Grakh, K. , Mittal, D. , Prakash, A. , and Jindal, N. , "Characterization and antimicrobial susceptibility of biofilm-producing Avian Pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens and their environment in India," Veterinary Research Communications. (2022), V. 46, n° 2, 537–548.
200. Vounba, P. , Yaghoubi, K. , Ndiaye, C. , Arsenault, J. , Fairbrother, J. M. , and Bada Alambédji, R. , "Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in Senegal," Foodborne Pathogens and Disease. (2018), V. 15, n° 8, 517–525.