

679THV-1

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB BLIDA
FACULTÉ DES SCIENCES agro-vétérinaire et biologie
DÉPARTEMENT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRE

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de « docteur vétérinaire »

THEME :



Présenté par :

Mr: ABANE ALI

Mr: TIGHEDINE RABAH

Devant les membres de jury :

- Mme: Baazize Ammi Djemila M.A.A USDB Président.
- Mme: Hammami Nabila M.A.B USDB Examinatrice.
- Mr: Bachir Pacha Mohammed. M.C.A USDB Promoteur.

Année universitaire : 2010 / 2011.

Remerciements

Nos sincères remerciements à Mr Bachir Pacha Mohammed maître de conférences à l'université SAAD DAHLEB de Blida, notre promoteur qui nous a soutenus tout au long de ce travail et qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

A Mme Kechih responsable du service de microbiologie au laboratoire vétérinaire régionale de D.B.K ainsi que ces assistants, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter notre démarche laborantin.

A Mme BAAZIZE AMMI DJEMILA maître assistante à l'université SAAD DAHLEB du BLIDA, qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury et qui a accepter d'examiner notre travail.

A Mme HAMMAMI. N, maître assistante à université SAAD DAHLEB du BLIDA, qui nous a fait l'honneur de faire partie des membres de jury et d'examiner ce modeste travail.

Nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de pré ou de loin au bon déroulement de ce projet.

Dédicace

A ceux qui ont fait de moi ce que je suis.....a mes parents qui resteront le modèle de réussite en tout points, qui m'ont écouté, compris et m'ont donné confiance durant les moments les plus difficile de travail. Qu'ils trouvent ici un modeste témoignage de tout l'amour que j'ai pour eux.

A mes frères : Amara, Beleid, Makhlouf, Amoukrane et Abdrezak.

A mes sœurs : Sadia, Saïda.

A ma grande mère : Amrouche Zaina.

A mes cousins : Amar, Khedar et à leurs parents.

A toi Rabah et toute ta famille

A tous les familles Amrouche et Abane.

A tous mes amis d'ici (Damen, Belka(l'acteur), mouhend et à tous les amis de la cité o2) et d'ailleurs pour tous les moments partagés, que je n'énuméré pas au risque d'en oublier.

A tous ceux qui me sont chers et je n'ai pas citées.

Je dédie ce modeste travail

Ali

Dédicace

*Je dédie ce travail à celle qui aucun mot n'aura à rendre ce que
une mère peut donner pour son fils*

A ma grand-mère qui ma tant gâté, que dieu la garde pour nous

A mon père

*A mon grand-père, que dieu le tout puissant accueille son âme au
paradis*

A ma sœur Farida, pour qui je souhaite tout le bonheur du monde

A toute ma famille

A mes amis

A toi Ali et à toute ta famille

A tous ceux et celles qui me sont très chers

Rabah

Sommaire

Introduction

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Généralités Sur L'espèce Bactérienne Etudiée

A. Bactériologie.....	01
1. Historique et taxonomie	01
2. Morphologie et culture.....	01
3. Caractères biochimiques	01
4. Structure antigénique et immunogène.....	02
• les différents types d'antigènes.....	02
• relation entre sérotype et virulence.....	03
B. Expressions cliniques de l'infection :.....	04
• les colibacilloses respiratoires et la colisepticémie.....	04
• mortalité embryonnaire et mortinatalité.....	05
• ovarites et salpingites chroniques chez l'adulte.....	06
• formes plus rares.....	07

CHAPITRE II: Usages des antibiotiques en médecine vétérinaire

1. Usages pratiques des antibiotiques en médecine vétérinaire.....	09
2. Les molécules utilisées.....	12
2.1. En médecine vétérinaire.....	12
2.2. En élevage avicole.....	13
3. Utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs.....	14

CHAPITRE III: Résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Définition de la résistance bactérienne.....	15
2. Origine de la résistance.....	15
3. Différents types de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	16
A. Résistance naturelle	16
B. Résistance acquise	16
b1) support chromosomique.....	16
b2) support extra chromosomique.....	16

CHAPITRE IV : l'antibiogramme

1. Généralité et définition.....	17
2. Principe.....	18
2.1. Méthodes de dilution en tube ou en gélose.....	18
2.2. Méthodes de diffusion sur gélose.....	18

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes.....	20
I.1. Matériel.....	20
I.2. Méthodes	22
I.2.1 Autopsie	22
I.2.2 Bactériologie	23
I.2.2.1 Isolement et identification des bactéries	23
I.2.2.1.1 Isolement	23
I.2.2.1.2 Identification.....	24
I.2.3 Antibiogramme.....	26
I.3 Contrôle de qualité	29
Résultats et interprétation.....	30
Conclusion	39
Annexe	40

Résumé

En vue d'étudier l'antibiorésistance d'*Escherichia coli* d'origine aviaire aux antibiotiques, Quarante quatre souches d'*Escherichia coli* ont été isolées à partir d'organes de volailles (poussins, poules pondeuses, poulets de chair). Après isolement et identification des souches, des antibiogrammes ont été réalisées par la méthode de diffusion sur gélose. Sur l'ensemble des isolats presque la totalité s'est avérée résistante à l'ampicilline et à l'association Amoxicilline- acide clavulanique avec des taux respectifs de 90% et de 97%. Une résistance aussi significative pour la tétracycline 88%. A l'opposée les sensibilités les plus marquées ont été signalées pour le Cefotiofur avec un taux de 77% et la colistine pour qui (97%) des souches sont sensibles.

Mots clé : *Escherichia coli*, volailles, Antibiotiques, Antibiogramme, Antibiorésistance.

INTRODUCTION

Les antibiotiques sont utilisés dans la lutte contre les infections bactériennes depuis la découverte de la pénicilline en 1929. Les nouvelles molécules sont d'abord utilisées en médecine humaine puis leur emploi s'est étendu à la médecine vétérinaire. L'utilisation de ces antibiotiques s'accompagne inéluctablement de l'apparition de résistances acquises, par les souches d'origine humaine ou animale, rendant l'efficacité des thérapeutiques plus aléatoire.

Actuellement, le recours systématique aux antibiotiques est fréquent en aviculture, leur usage est déraisonné, avec des objectifs diversifier dépassant l'aspect thérapeutique. Ce qui conduit de plus en plus à la sélection de bactéries multirésistantes.

Tout ça nous a motivés à évaluer la résistance de la souche *Escherichia coli* d'origine aviaire, fréquemment rencontrées dans les processus pathologiques chez la volaille. Et souvent responsable de pertes économique très importantes, de part la gravité de la maladie mais aussi des échecs thérapeutiques qui y sont associés.

Dans une première partie, nous décrirons les principaux caractères de l'espèce étudiée ainsi que la genèse de la résistance bactérienne. Puis on expliquera les différentes modalités de réalisation d'un antibiogramme. Dans la seconde partie, on exposera les procédés d'isollements et la technique d'évaluation de l'antibiorésistance.

L'objectif principal de cette étude est de faire un état des lieux du niveau de résistance d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. Une epidémiosurveillance actualisée nous semble primordiale dans une lutte efficace contre l'émergence d'une antibiorésistance qui ne cesse de prendre une cinétique alarmante.

En synthèse, la prescription d'une antibiothérapie raisonnée en élevage avicole nous semble essentielle, cette étude a pour but de guider au mieux cette prescription qui est majeure pour les animaux, mais aussi pour la santé humaine.

CHAPITRE I : Généralité sur l'espèce
bactérienne étudiée

CHAPITRE I : Généralités sur l'espèce bactérienne étudiée**A. Bactériologie****1. Historique et taxonomie :**

Escherichia coli fut initialement isolé et décrit par le pédiatre allemand Théodore Escherich, en 1885. Celui-ci démontra son existence comme hôte normal de l'intestin de l'enfant et pour marquer à la fois ce tropisme et la fréquence de son isolement, l'appela *Bacterium coli* commune, ce que l'on peut traduire par «bactérie commune du colon».

C'est en 1919 que Castelani et Chalmers lui donnent son nom définitif en hommage à Escherich, *Escherichia* est ensuite devenu le genre-type de la famille des *Enterobacteriaceae* et *E. coli* l'espèce type de ce genre. [25]

2. Morphologie et culture :

Escherichia coli est un bacille gram négatif uniformément coloré, non sporulé, appartenant à la famille des entérobactéries. Sa taille (2-3 x 0.6 μm) et sa forme peuvent varier et de nombreuses souches possédant des flagelles péritriches sont mobiles. *E. coli* pousse sur milieu ordinaire à des températures comprises entre 18 et 44° C.

Incubées 24 heures sur gélose agar à 37°C, les colonies sont convexes, lisses et incolores. Elles ont en général un diamètre compris entre 1 et 3 mm avec une structure granulaire et une marge intacte [17]. Les *E. coli* des volailles possèdent les mêmes propriétés biochimiques que celles isolées à partir d'autres espèces.

3. Caractères biochimiques :

Les principaux caractères biochimiques d'*E. coli* sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau I.2 – les principaux caractères permettant l'identification d'*E.coli*. [15]

Caractère	<i>E. coli</i>	Caractère	<i>E. coli</i>	Caractère	<i>E. coli</i>
Indole	+	Citrates de Simmons	-	LDC	D
Urease	-	ONPG	+	ODC	D
Mannitol-mobilité	+	H ₂ S	-	ADH	D
Lactose	+	Malonate	-	TDA	-
Gaz en glucose	+	Nitratase	+	VP	-
Saccharose	d	Gélatinase	-	RM	+

(+) : test positif

(-) : test négatif

(d) : test différent selon les sérotypes

On peut rencontrer des variant négatifs pour les caractères habituellement positifs :

L'indol par exemple est consécutif à une mutation.

A l'inverse, on peut exceptionnellement rencontrer des variant positifs pour un caractère habituellement négatif : la production d' H₂S par exemple est dans tels cas souvent codé par un plasmide.

4. Structure antigénique et immunogène :

Chaque souche d'*E.coli* est définie par un sérotype lui-même déterminé par l'association de différents antigènes. Ce sérotype est déterminant dans la pathogénicité de la bactérie.

- Les différents types d'antigènes :

On distingue environ 157 antigènes somatiques de type O (Ag O) chez les colibacilles. L'antigène somatique ou antigène de la paroi est l'endotoxine libérée lors de l'autolyse des cellules. Il est composé de complexes des phospholipides et polysaccharides avec une fraction protéique résistant a l'ébullition. Quinze (15) sérotypes sont actuellement recensés chez les volailles. L'antigène capsulaire (Ag K), dont on dénombre 99 types différents, est constitué de polymères d'acide contenant des sucres réducteurs (2%). Ils peuvent être dénaturés lors du

chauffage à 100°C pendant une heure. Selon leur stabilité à la chaleur les antigènes K sont subdivisés en 3 groupes : L, A et B. Se retrouvant à la surface des cellules ils sont associés à la virulence de la souche et interviennent lors de l'agglutination des antigènes O. Quant à l'antigène flagellaire (Ag H) il est utilisé pour l'identification d'*E.coli* et n'intervient pas dans la pathogénicité. Il s'agit de protéines détruites lors du chauffage à 100°C.

- Relation entre sérotype et virulence :

Plus de 1000 sérotype d'*E.coli* ont été identifiées mais seul un petit pourcentage impliqué dans l'atteinte des sacs aériens des volailles. Plusieurs études sérologiques ont révélé que les prélèvements associés à une infection par *E. coli* chez les volailles correspondent principalement aux sérogroupes O1, O2 et O78 [9]. La très grande variété de souches a été étudiée à l'aide de critères variés : fermentation des sucres, sérotypage des antigènes somatiques O, flagellaires H et capsulaires K, électrophorèse des protéines de la membrane externe, résistance aux colorants, antibiorésistance, profil plasmidique, polymorphisme des gènes codant les enzymes [23]. En effet plusieurs équipes ont recherché des marqueurs de virulence. Certains chercheurs ont remarqué que les sérotypes O1, O2 et O78 avaient des propriétés biochimiques similaires, telles que la fermentation de certains sucres ou de réactions enzymatiques. Ils ont alors supposé qu'une forte activité métabolique pourrait être caractéristique de souches fortement virulentes ou de sérotypes spécifiques associés aux colibacilles aviaires [18]. Selon CLOUD et coll. (1985) [9], pour les souches isolées de volailles, il ne semble pas exister de corrélation entre les caractères biochimiques, la mobilité, la résistance aux antibiotiques et la pathogénicité. De fait, les études épidémiologiques [9] révèlent que chez le poulet, les sérotypes les plus fréquemment isolés sont O2 (26,6%) et O78 (11,3%) : 30/47 des souches O2 et 16/20 des souches O78 testées se révèlent hautement pathogènes pour le poulet. Parmi les 1000 sérotypes connus un faible nombre joue un rôle important en pathologie aviaire. Trois groupes sérologiques O1K1, O2K1, O78K80 représentent la majorité des souches pathogènes de colibacilles aviaires. Par contre d'autres sérotypes pathogènes sont isolés (O35) et peuvent révéler une certaine spécificité pour une espèce (O86 et le canard) ou pour une expression clinique particulière de la maladie (O15 pour les synovites, O109 pour les aérosacculites). Lors de l'expérimentation le choix de la souche se fera parmi les sérotypes les plus fréquemment rencontrés. De plus la virulence de cette souche devra être suffisamment importante pour permettre des résultats significatifs.

B. Expressions cliniques de l'infection :

Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, *E. coli*, chez les volailles, n'est qu'assez peu impliqué en pathologie digestive mais participe à des syndromes variés évoluant sous forme septicémique ou localisée, maladie respiratoire chronique, omphalite, synovite, salpingite, coligranulomatose [27].

Ces infections extra intestinales, systémiques sont dues aux propriétés invasives des souches en causes bien que la dissémination des bactéries se fasse le plus souvent à partir du système respiratoire [13].

Les manifestations cliniques sont différentes suivant l'âge de l'animal.

- Les colibacillooses respiratoires et la colisepticémie :

La colibacillose respiratoire et la colisepticémie représentent une dominante pathologique chez les poulets de chair élevés industriellement. Elles se présentent souvent chez les animaux de 6 à 10 semaines comme une complication d'une infection mycoplasmique ou virale (virus de la bronchite infectieuse IBV, virus de la maladie de Newcastle NDV dont les souches vaccinales) survenue dans les deux ou trois premières semaines de vie, les conditions d'ambiance jouant un rôle déterminant dans l'apparition et la gravité du processus [27].

L'infection naturelle de l'appareil respiratoire des volailles par *E. coli* semble se produire lors d'inhalation de poussières contaminées par les fientes. Le lieu précis où les *E. coli* se déposent au niveau du tractus respiratoire n'est pas connu. Pour éliminer les particules inhalées, les poumons des oiseaux dépendent principalement de la phagocytose par les cellules épithéliales de la zone des parabronches. Ils ne possèdent pas de défense cellulaire similaire aux macrophages alvéolaires des mammifères au niveau de la zone d'échange des gaz. D'autre part il n'y a aucun mécanisme de défense cellulaire au niveau des sacs aériens et leur protection dépend de l'afflux de polynucléaires hétérophiles lors de l'inflammation.

Ainsi, les régions d'échanges gazeux entre le poumon et les sacs aériens sont relativement sensibles à la pénétration et à la multiplication des bactéries. La zone des capillaires aériens du poumon est alors un important site d'entrée des *E. coli* dans le système circulatoire des oiseaux [33].

- La maladie respiratoire chronique

L'inhalation de poussière contaminée par les coliformes est la plus importante source d'infection des sacs aériens. L'exposition à la poussière et à l'ammoniac entraîne la dé ciliation du tractus respiratoire supérieur des oiseaux. Ensuite les voies respiratoires non indemnes deviennent très sensibles à l'invasion d'*E. coli* ce qui permet aux *E. coli* inhalées d'infecter les

sacs aériens [17], [30]. La maladie résultante est communément appelée maladie des sacs aériens ou maladie respiratoire chronique.

La maladie des sacs aériens apparaît principalement chez les poulets âgés de 5 à 12 semaines avec un pic entre 6-9 semaines. Les oiseaux malades sont prostrés, anorexiques et présentent des symptômes respiratoires non spécifiques (éternuements, râles, toux, jetage, larmolements, sinusite). L'extension de l'infection (aérosacculite) provoque des lésions fibrineuses des séreuses (péricardite et une péri hépatite). Plus rarement une panophtalmie, une salpingite, et des infections des os et des structures synoviales peuvent apparaître après une septicémie. La morbidité dépasse souvent 20% et la mortalité reste inférieure à 5% sauf complications [37].

Les formes subcliniques provoquent une diminution de la prise alimentaire et les conséquences de la maladie sont surtout d'ordre économique et condamnent les oiseaux à l'abattage [17], [27].

➤ La colisepticémie :

E. coli est isolée d'une maladie infectieuse intense ressemblant à la fièvre typhoïde et au choléra chez des poulets et des dindes adultes. Les oiseaux affectés sont en bon état général et ont le jabot plein, ce qui indique la nature aiguë de l'infection.

Les lésions les plus caractéristiques sont un foie vert et des muscles pectoraux congestionnés. Parfois de petits points blancs sur le foie sont décrits. Lors d'une colisepticémie moins virulente, il y a une tendance à développer une péricardite et une péritonite [21]. La plupart des *E coli* sont responsables de péricardite après une phase de septicémie. La péricardite est habituellement associée à une myocardite. Le sac péricardique devient trouble et l'épicarde devient oedémateux et recouvert d'un exsudat coloré. Le sac péricardique est souvent rempli d'un exsudat fibrineux jaunâtre. L'association péricardite myocardite entraîne une baisse de la pression sanguine.

• Mortalité embryonnaire et mortinatalité :

Des poules inoculées expérimentalement peuvent excréter des *E. coli* dans plus de 26 % de leurs œufs alors que 0,5 à 6 % des œufs d'une poule saine renferment des *E. coli*. En effet la bactérie peut occasionnellement être isolée de vitellus d'apparence normal. Dans cette pathologie on peut considérer que celle-ci est l'agent primaire de l'infection [16], [22], [12].

La contamination fécale est la source d'infection des œufs la plus importante. Les autres sources, plus rare, sont les infections ovariennes ou les salpingites. En raison du gradient de température, les microorganismes sont aspirés à travers la coquille poreuse, tandis que

d'autres peuvent pénétrer de façon active en faveur de l'humidité de la surface de la coquille [3].

Le lieu de l'infection est le vitellus de l'embryon. De nombreux embryons meurent avant l'éclosion, particulièrement en fin d'incubation. Ensuite l'incidence de l'infection augmente peu après l'éclosion et se réduit après 6 jours: quelques uns meurent peu après l'éclosion et la perte de poussins continuent jusqu'à l'âge de 3 semaines. Les poulets éclos d'œufs contaminés par *E. coli* présentent souvent une inflammation de l'ombilic (omphalite), cause de mortalité. Les poulets ou la volaille survivant plus de 4 jours peuvent présenter une péricardite, preuve de la diffusion systémique depuis le sac vitellin. Mais il est possible de n'avoir aucune mortalité, les seules manifestations de l'infection du vitellus étant la rétention du sac infecté et la réduction du gain de poids [17].

Suite à l'infection par *E coli* le contenu normal du sac vitellin (visqueux, jaune-vert) change pour devenir plus liquide, marron jaune voire caséeux [17].

- Ovarites et salpingites chroniques chez l'adulte [17], [27].

Les formes génitales observées chez les poulettes de 4 à 13 semaines ou chez les adultes accompagnent ou non les manifestations respiratoires et se traduisent par des chutes de ponte survenant en particulier au 2-3ème mois de ponte, des morts subites (2 à 3% par mois) ou des diarrhées blanches. L'autopsie révèle des lésions d'ovario-salpingite et de péritonite.

Quand le sac abdominal gauche est infecté par *E. coli*, de nombreuses femelles développent une salpingite chronique caractérisée par une importante masse caséuse au niveau d'une zone dilatée de l'oviducte à paroi amincie. La masse caséuse contient de nombreux polynucléaires hétérophiles nécrotiques et des bactéries qui persistent pendant plusieurs mois.

La taille de la masse caséuse peut augmenter avec le temps. Les salpingites peuvent aussi apparaître suite à l'entrée de coliformes par le cloaque chez les poules pondeuses. Une péritonite, caractérisée par une mortalité intense, de la fibrine et la présence d'un jaune libre dans la cavité abdominale, sont observés parfois suite à la ponte intra abdominale d'un ovule infecté.

Les oiseaux infectés meurent fréquemment au cours des 6 premiers mois suivant l'infection; les survivantes pondent rarement des oeufs. Cette forme génitale de l'infection provoque chez le poussin des mortalités embryonnaires (15 à 20%), des mortalités en coquille (3 à 5%) et des mortinatalités (10 à 20%). Les lésions peuvent évoquer celle de la pullorose :

- Omphalite et rétention du sac vitellin;
- Foyers de nécrose hépatique;

- Arthrite ;
- Péritonite.

- Formes plus rares :

- Infection synoviale [17].

E. coli a été isolée d'articulations de poulets. Cette infection synoviale est souvent le témoin d'une septicémie. De nombreux oiseaux guérissent au bout d'une semaine, tandis que les autres développent une infection chronique et peuvent devenir décharné.

- La panophtalmie [17].

La panophtalmie est une manifestation peu commune de la colisepticémie. Elle se traduit par un hypopyon, habituellement sur un œil qui devient aveugle. La plupart des oiseaux meurent peu de temps après le début des lésions. La choroïde devient hyperémique et la rétine est complètement détruite.

- La coligranulomatose ou maladie de Hjiarre [17]:

La coligranulomatose est une forme de colibacillose devenue relativement rare. Néanmoins la mortalité peut atteindre plus de 75 %. Elle est caractérisée par l'apparition de multiples petites formations nodulaires sur l'intestin grêle, les caeca, le mésentère et le foie. Il n'y a pas atteinte de la rate ce qui facilite le diagnostic différentiel avec la tuberculose. Les lésions séreuses peuvent ressembler à celle de la leucose. Il y a confluence de zones nécrotiques sur la moitié du foie. Seuls quelques polynucléaires hétérophiles dispersés sont visibles et à la frontière des zones nécrotiques il y a peu de cellules géantes.

- Entérite

E. coli a été isolée chez des volailles lors d'entérites mais les recherches ne sont pas suffisantes pour indiquer qu'il s'agit de l'étiologie. L'infection du tractus digestif par *E. coli* est habituellement secondaire à d'autres affections du type coccidiose, entérite nécrotique, Histomonose, parasitisme (vers ou champignons), ou suite à des circonstances débilitantes telle la malnutrition [32]. Les lésions observées correspondent à une inflammation sévère de l'intestin, de larges plaques épaissies et œdémateuses contenant du sang et du mucus. Les poulets atteints présentent une diarrhée, différents degrés de déshydratation et une baisse rapide de l'état général [3].

- La dermatite à *E. coli*

C'est une maladie de surpeuplement et de mauvaise hygiène, associée à des problèmes de santé dans les élevages. D'ailleurs les élevages ayant peu de problèmes de santé ont aussi peu de saisies causées par la dermatite nécrotique. [17].

Antibiorésistance :

Les mesures de contrôle d'infection par *E. coli* associée à la maladie dépendaient surtout de mesures prophylactiques ou de l'emploi thérapeutique de certains antibiotiques, de la vaccination contre les virus respiratoires et de mesures sanitaires concernant les couvoirs. Or les souches résistantes aux antibiotiques se multiplient.

La résistance à un ou plusieurs antibiotiques peut être transférée par l'intermédiaire des plasmides de façon intra spécifique, interspécifique ou entre des bactéries de genres différents. Par exemple, bien que la streptomycine soit rarement utilisée, la forte résistance à cet antibiotique peut être associée

Aux transferts de plasmides responsables aussi de la résistance aux tétracyclines [17]. D'autres marqueurs de virulence ont été étudiés : le pouvoir hémagglutinant, la sensibilité au mannose et l'hydrophobicité de surface cellulaire dont sont pourvues respectivement plus de 62% et 85% des souches virulentes [27].

CHAPITRE II : Usages des
antibiotiques

CHAPITRE II: Usages des antibiotiques

1. Usages des antibiotiques en médecine vétérinaire

Selon Bezoen et al, 1999 [5]; Guillemot, 2006 [19]; Jacquemin, 2006 [20] les antibiotiques peuvent être utilisés de quatre façons différentes, avec des objectifs variables :

- les antibiotiques sont tout d'abord utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Le traitement a aussi pour effet de réduire la souffrance et de restaurer la production (lait, viande). Il réduit l'excrétion bactérienne, permettant dans certains cas d'obtenir une guérison bactériologique et, lors d'infection zoonotique, il peut éviter la contamination humaine.

- lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques (sains ou en incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades. Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie. Elle permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse alors qu'ils sont encore en incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes.

- les antibiotiques peuvent, parfois, être administrés à des périodes critiques de leur vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue, après contrôle de la nature de l'infection par des examens de laboratoire. Dans ces conditions, on parle d'antibioprévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être provisoire. L'antibioprophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes.

- l'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs en vue d'améliorer la croissance a fait l'objet de nombreuses critiques. Il est très limité actuellement et été totalement abandonné fin 2005 en Europe. Ces antibiotiques régulateurs de flore (ARF) ou antibiotiques promoteurs de croissance (AGP pour antibiotic growth promoters) sont utilisés à des doses très faibles, non curatives et sont tous des agents chimiothérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur. Le tableau (02) résume les principaux types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à la consommation humaine.

Tableau N°02 : Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine, [24].

Type d'utilisation d'antimicrobiens	But	Voie ou mode d'administration	Administration individuelle ou par groupe	Animaux malades
Thérapeutique	Thérapie	Injection, aliments, eau	Individuelle ou par groupe	Animaux malades ou certains animaux dans des groupes
Métaphylactique	Prophylaxie de la maladie, thérapie	Injection (veaux en parc d'engraissement), aliments, eau)	Groupe	Certains

Prophylaxie	Prévention de la maladie	Aliments	Groupe	Rien d'évident, bien que certaines infections puissent être subcliniques
Stimulateur de croissance	Stimulation de la croissance	Aliments	Groupe	Aucun
	Indice de consommation	Aliments	Groupe	Aucun

2. Les molécules utilisées

2.1 En médecine vétérinaire :

Le tableau (03) présente les molécules utilisées en médecine humaine et précise si elles le sont également chez l'animal.

Tableau n° 03 : Les molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire, [10], [8].

Famille	Sous-famille	Molécule(s)	Usage chez l'Homme	Usage chez l'animal
Bétalactamines	Pénicillines	Pénicilline G	×	×
		Pénicilline V	×	
		Pénicilline M	×	×
		Pénicilline A	×	×
		Carboxypénicilline	×	
		Uréidopénicilline	×	
	Céphalosporines	Première génération	×	×
		Deuxième génération	×	×
		Troisième génération	×	×
		Monobactames	×	
Cyclines		×	×	
Aminosides		×	×	
Macrolides		×	×	
Apparentés aux Macrolides	Lincosamides		×	×
	Kétolides		×	
	Synergistines/streptogramines		×	
Quinolones	Première génération		×	×
	Deuxième		×	×

	génération			
Furanes			×	×
Phénicolés			×	×
Triméthoprimes			×	×
Polymoxines			×	×
Sulfamides			×	×
Glycopeptides			×	×
Imidazolés			×	×
Antituberculeux			×	×
Divers		Acide fusidique	×	×
		Bacitracine	×	×
		Clofazimine	×	
		Dapsone	×	
		Fosfomycine	×	
		Fumagilline	×	
		Mupirocine	×	
	Oxazolidinones	Linézolide	×	
	Thyroricine	×	×	

2.2. Les antibiotiques utilisés en élevage avicole :

Le tableau (04) indique les principaux antibiotiques utilisés en élevage avicole.

Tableau n° 04 : Principaux antibiotiques utilisés en aviculture [29].

Famille	Exemples
Bétalactamines	Aminopénicillines : Ampicilline et Amoxicilline
	Céphalosporines : Cefotiofur
Aminosides et apparentés	Dihydrostreptomycine (DHS), Gentamycine, Néomycine, Spectinomycine, Framycétine
Quinolones	Acide oxolinique, Fluméquine, Enrofloxacin, Difloxacin, etc.
Tétracyclines	Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline
Polypeptides	Colistine (polymyxine E)

Macrolides et apparentés	Érythromycine, Josamycine, Lincomycine, Spiramycine, Tylosine, Tilmicosine, Tiamuline (pleuromutiline)
Sulfamides	Sulfadiazine, Sulfadimidine, Sulfadiméthoxine, Sulfaquinoxaline
Diaminopyrimidines	Triméthoprim

3. Utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs

3.1. Définition d'additif:

Un additif est défini selon l'Union Européenne comme étant toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique au stade de leur fabrication, transformation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage, a pour effet qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires [34].

3.2. Les effets des additifs :

Selon Guillemot, 2006 [19] les additifs sont ajoutés aux aliments pour animaux ou à l'eau pour remplir notamment une ou plusieurs des fonctions suivantes :

- avoir un effet positif sur les caractéristiques des aliments pour animaux.
- avoir un effet positif sur les caractéristiques des produits d'origine animale.
- répondre aux besoins nutritionnels des animaux.
- avoir un effet positif sur les conséquences environnementales de la production animale.
- avoir un effet positif sur la production, le rendement ou le bien être des animaux notamment en influençant la flore gastro-intestinale ou la digestibilité des aliments pour animaux.
- avoir un effet coccidiostatique ou histomonostatique.

CHAPITRE III : Résistance bactérienne aux antibiotiques

CHAPITRE III : Résistance bactérienne aux antibiotiques

Les micro-organismes ont développés des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens. Cette dernière apparait plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des ATB et de patrimoine génétique de la bactérie [6].

1. Définition de la résistance bactérienne

Une souche est dite résistante quand elle supporte une concentration d'ATB beaucoup plus élevée que celle qui inhibe la majorité des autres souches de la même espèce. En effet cette résistance se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétiques [1].

2. Origine de la résistance :

Les premiers antibiotiques, découverts au début du XXème siècle, étaient des substances naturelles ou semi-synthétiques produites par des champignons ou des bactéries, leur permettant ainsi de concurrencer d'autres micro-organismes pour les substrats. Les bactéries ont donc été en contact avec les antibactériens bien avant la mise en évidence de leurs vertus thérapeutiques, ces derniers exerçant donc sur les souches une pression de sélection à bas bruit [38]. Les microbes produisant naturellement les substances antibactériennes possèdent des moyens de défense les protégeant contre leurs actions. La pression de sélection qu'elles ont exercée sur les autres espèces a poussé ces dernières à développer des mécanismes d'échappement, qui peuvent être de trois sortes :

- Acquisition et modification de gènes de résistance provenant des micro-organismes producteurs d'antibiotiques,
- Mutation d'un gène jouant un rôle physiologique pour la bactérie, orienté vers la production d'une enzyme dégradant certains agents antimicrobiens,
- Modification de la cible de l'antibiotique, la rendant insensible aux antibactériens. Depuis l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique, la pression de sélection s'est accrue, favorisant les bactéries ayant acquis des moyens de défense. Ce contact permanent avec les antibactériens et la coexistence de nombreuses bactéries dans un même milieu sont les facteurs essentiels de l'émergence de la résistance [38]. L'implication de l'usage thérapeutique des antibiotiques en élevage a été démontrée dès les années 50, avec

l'apparition de souches résistantes à la streptomycine, aux sulfamides ou aux tétracyclines peu de temps après leur commercialisation. Ceci s'est confirmé avec d'autres molécules plus récentes (ampicilline, gentamicine) [19].

Une autre hypothèse concernant l'origine des gènes de résistance évoque le détournement de gènes bactériens de leur rôle premier : en particulier, les éléments responsables de l'export des antibiotiques dériveraient des transporteurs de sucres [7].

Quelle que soit la définition considérée, selon la discipline qu'il l'étudie, la résistance bactérienne se traduit sur le plan clinique par des échecs thérapeutiques. Existant bien avant la découverte des premiers antibiotiques, elle s'est développée sous l'effet de la pression de sélection qu'a générée leur utilisation.

3. Différents types de résistance bactérienne aux antibiotiques

Deux types de résistance sont à distinguer :

a) Résistance naturelle :

C'est une caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne sans jamais être en contact l'antibiotique. Elle est toujours transmissible à la descendance car elle est portée par un chromosome ainsi détermine les phénotypes « sauvages » des espèces bactériennes [1].

b) Résistance acquise :

Elle ne s'applique que pour certaines souches au sein de la même espèce bactérienne cette résistance est variable dans le temps. Dont elle est due à une modification génétique comme la maturation ou acquisition de matériel génétique étranger. De ce fait deux supports essentiels sont à noter :

b1) support chromosomique : il s'agit de la maturation ponctuelle soit dans un gène de structure modifiant le spectre d'une enzyme.

b2) support extra chromosomique : c'est l'information génétiques portée par des plasmides transférable à d'autres bactéries. [35].

CHAPITRE IV : Antibiogramme

CHAPITRE IV : Antibiotogramme

1. Généralités et définition :

L'antibiogramme ou la détermination de la sensibilité des bactéries aux agents antibactérienne en présence d'un gradient de concentration réalisé dans des milieux de culture, [28].

Selon Henry, Leclerc l'antibiogramme est la méthode analytique qui permet de définir in vitro l'antibiotique le plus actif sur un germe, donc celui qui a le plus de chance de guérir le malade infecté par ce germe. Elle doit tenir compte d'un certain nombre de facteurs susceptibles de modifier l'activité antimicrobienne. Ces facteurs sont propres à l'antibiotique, à ses propriétés, au milieu et à la bactérie. [26].

1.1. L'antibiotique :

Il doit être stable et conserver son activité au cours du test :

A la température de 37°C, habituellement la plus favorable à la croissance microbienne, certains antibiotiques la perdent ainsi en vingt quatre heures à pH égal 7.

Le pouvoir de diffusion de l'antibiotique joue aussi un rôle capital au cours de la mesure en milieu solide. Il n'est pas souhaitable d'évaluer la sensibilité des microorganismes à la polymyxine sur un milieu gélosé ou cet antibiotique diffuse mal. [26].

1.2. Le milieu :

Il doit avoir une composition rigoureusement définie, permettant une reproduction fidèle des résultats.

Les milieux contenant du sang ou du sérum stimulent assez fortement la croissance bactérienne. Sauf nécessité, ils ne sont pas indiqués car ils peuvent inhiber l'activité antibiotique. Le glucose augmente celle de la pénicilline et diminue celle de la streptomycine. Le pH est sans doute un des facteurs les plus influents. Le pouvoir optimum de chaque antibiotique est conditionné par un pH optimum : la pénicilline est la plus active en milieu acide, à pH égal à 6.6, la streptomycine l'est d'avantage en milieu

alcalin puisqu'elle est cent fois plus active à Ph égale à 7.4 qu'à Ph égale à 6. En définitive, au cours des mesures, la situation la plus sage consiste à choisir le pH neutre. [26].

1.3. La bactérie :

Le nombre de bactéries mises au contact de l'ATB devrait être toujours le même. En milieu solide, les zones d'inhibition observées autour des sources d'ATB sont inversement proportionnelles à l'abondance de l'inoculum.

Les microorganismes à croissance rapide sont les plus sensibles à l'action d'antibiotique.

Le terme d'incubation des cultures ne doit pas être prolongé car l'ATB, en perdant son activité, favorise la multiplication des cellules les moins sensibles. [26].

2. Principe :

C'est la technique d'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne à plusieurs méthodes. [2]

Peuvent être utilisées pour établir un antibiogramme :

2.1 Méthodes de dilution en tube ou en gélose :

Peu utilisées car elles sont trop longues et permettent d'étudier qu'un seul antibiotique à la fois. [36].

2.2 Méthodes de diffusion sur gélose : [4], [11].

Couramment utilisées, ces techniques sont une simplification de la sensibilité aux antibiotiques.

Des disques de papier buvard, imprégnés d'une quantité définie d'antibiotiques, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance.

L'antibiotique diffuse dans toutes les directions et il se forme un gradient de concentration à partir de la source (disque). Après incubation de dix huit heures à 35°C, on

constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne dont le diamètre est plus au moins large.

Les points où s'arrête la multiplication bactérienne correspondent à la CMI, mais la lecture et l'interprétation sont faites en termes de diamètre d'inhibition.

L'antibiogramme classe les bactéries en trois catégories :

- Sensible (S)
- Intermédiaire (I)
- Résistante (R)

Partie pratique

Objectif de l'étude :

Toutes les bactéries peuvent développer des résistances aux antibiotiques, ce qui impose pratiquement le recours à l'antibiogramme. Pour la bactérie *Escherichia coli*, qui fait l'objet de notre étude, on a fait recours à cette étape qui est nécessaire pour définir la stratégie de la thérapie et le choix de l'ATB.

Notre étude s'est déroulée à DBK, sur une période de six (6) mois (De novembre 2010 jusqu'à mars 2011)

I. Matériel et méthodes :

I.1 Matériel :

- Matériel biologique :

Les souches bactériennes ayant servis à notre étude ont été isolées aux niveaux de service bactériologique du laboratoire vétérinaire régional de DBK.

• Nature et origine:

Les analyses bactériologiques pratiquées au laboratoire ont été effectuées sur divers prélèvements à partir d'organes (foie, cœur et rate) de volailles (poussins, poules pondeuses et poulets de chair) à différents stade d'élevage.

• Nombre :

Deux cent cinquante trois (253) prélèvements ont été effectués à partir d'organes de volaille, sur lesquels 44 sont infectés par *Escherichia* :

- Vingt neuf (29) souches d'*Escherichia coli* ont été isolées à partir du foie.
- Sept (7) souches d'*Escherichia coli* ont été isolées à partir de la rate.
- Huit (8) souches d'*Escherichia coli* ont été isolées à partir du cœur.

Tableau N°05 : les prélèvements effectués.

Nombre de prélèvements effectués	Organe à partir duquel le germe a été isolé
29	Foie
7	Cœur
8	Rate

- Matériel non biologique :
- Milieux de culture : (voir annexe)

Tous les milieux sont fabriqués par l'institut pasteur d'Algérie (IPA).

- Réactifs et solutions : (voir annexe)
- Verrerie et appareillage : (voir annexe)
- Les antibiotiques :

Nous avons utilisé des disques de 6 mm de diamètre imbibés d'antibiotique à des concentrations connues, livrés par l'institut pasteur de PARIS fabriqués par « BIORAD® ».

Les antibiotiques que nous avons testés sur les souches d'*Escherichia coli* isolées au niveau du laboratoire de DBK sont représentés dans le tableau ci-dessous. (Toute la gamme d'antibiotiques recommandés par l'OMS)

Tableau N°06 : liste des antibiotiques testés :

Boite de pétri (90mm Ø)	Antibiotique	Sigle	Charge
Boite 1	Céfotaxime/Ceftiofur	CTX/XNL	30 µg
	Amoxicilline + acide clavelanique	AMC	20/10 µg
	ampicilline	AM	10 µg
	Néomycine	N	30 µg
	Acide nalidixique	NA	30 µg
	Triméthoprim + sulfaméthoxasole	SXT	1.25/23.75 µg
	Colistine	CS	10Ug

Boite 2	Cephalothine	CF	30 µg
	Chloramphénicol	C	30 µg
	Tétracycline	TE	30 µg
	Oxytétracycline	OT	30 µg
	Enrofloxacin	ENR	5 µg
	Nitrofurantoïne	FT	300µg
Boite 3	Fluméquine	UB	30 µg

I.2 Méthodes :

I.2.1 Autopsie :

La qualité des résultats des examens bactériologiques à effectuer dépend étroitement de la qualité du prélèvement.

Le choix du prélèvement sera effectué selon la maladie suspectée.

a. Confection du prélèvement :

- Sur l'animal moribond ou très rapidement après sa mort.
- Avant tout traitement.
- Avec du matériel stérile

b. Protocole de prélèvement :

Il est souhaitable de fournir en vue d'un examen au laboratoire cinq volailles vivantes. Les animaux sont sacrifiés, puis placés en position dorsale sur un grand plateau :

- Désinfection des plumes à l'aide d'une solution aqueuse désinfectante.
- Incision cutanée médiane.
- On écarte latéralement les membres postérieurs jusqu'à désarticulation des hanches de l'animal déposé en décubitus dorsal.
- Incision de la peau du cou sur toute la ligne médiane d'un centimètre au dessous de cloaque jusqu'à l'arrière du bec et détacher ensuite la peau de cou de façon à découvrir la paroi abdominale.
- Sectionner la paroi abdominale un peu au dessus du cloaque à l'aide de ciseaux jusqu'aux cotés.
- Ouverture du cadavre et éviscération.

- Mise des viscères dans des boîtes de pétri stériles.

I.2.2 Bactériologie :

I.2.2.1 Isolement et identification des bactéries :

I.2.2.1.1 Isolement :

- Prélèvement :

➤ Organe :

Les organes prélevés sont : foie, rate et cœur.

- Broyage :

Les organes prélevés seront découpés en petit morceau à l'aide d'une paire de ciseaux et une pince stérile à changer pour chaque prélèvement.

- Pré-enrichissement :

Près du bec bunsen, mettre l'organe broyé (foie, rate ou cœur) dans un flacon contenant l'eau peptonnée puis incubé à 37°C pendant 30 minutes.

- Enrichissement :

Verser la solution précédente dans un bouillon sélénite puis incubé 24 heures à 35°C.

- Ensemencement :

A partir de chaque tube d'enrichissement, on prélève une goutte à l'aide d'une anse de platine stérile que l'on ensemence sur gélose BCP pour la recherche d'*Escherichia coli*.

La gélose BCP est spécifique pour les entérobactéries lactose (+). Les colonies d'*Escherichia coli* apparaissent jaunâtres.

- Incubation :

Incuber les boîtes de pétri pendant vingt quatre heures à 37°C à l'étuve.

I.2.2.1.2 Identification :

a. examen bactérioscopique :

En sélectionnant une à deux colonies de chaque boîte de pétri pour chaque colonie ayant les caractéristiques suivantes :

- Bien isolée
- Identique

a. Etat frais :

Principe :

Consiste à examiner les bactéries à l'état vivant en l'absence de toute fixation ou coloration.

But :

L'examen microscopique à l'état frais a pour but d'observer les bactéries à l'état vivant, d'étudier leur morphologie, leur mode de regroupement et leur mobilité, il permet aussi l'estimation quantitative du nombre des cellules dans un champ microscopique.

Technique :

Le matériel à examiner sera prélevé à partir d'un milieu de culture liquide ou solide ou même à partir d'un produit pathologique naturel.

Prélèvement et préparation des frottis :

- Prélèvement à partir d'un milieu liquide :

Sur la partie centrale d'une lame de microscope propre, déposer une gouttelette de la suspension de culture au moyen d'une pipette pasteur stérile ou d'une anse de platine, l'anse doit être stérilisée par flamage à la flamme d'un bec bunsen puis refroidie. Déposer sur la goutte une lamelle également propre, qui doit être bien orientée pour éviter la formation des bulles d'air. Examiner au microscope à l'objectif 40.

- Prélèvement à partir des cultures sur milieu solide :

Dans ce cas il faut s'adresser, le plus possible, à des cultures jeunes. Comme précédemment, choisir une lame porte-objet, déposer au centre une goutte d'eau distillée ou

d'eau physiologique, dans laquelle, on dissocie un fragment d'une colonie prélevée par pipette ou à l'anse de platine préalablement flambée et refroidie.

Lecture :

Escherichia coli est un Bacille, mobile.

b. Coloration de Gram :

Principe :

Les germes sont colorés en bleu violet avec le cristal violet phéniqué. après l'action d'un mordant (solution lugol), une décoloration à l'acétone-alcool est tentée. La safranine ou la fuschine basique agissent ensuite comme colorants de contraste.

But :

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en « Gram positives » et en « Gram négatives ».

Technique :

- Préparation et fixation des frottis :

Utiliser les lames propres, pratiquer l'étalement du germe, laissé sécher à l'air, puis fixer à la chaleur (passage rapide au dessus de la flamme) ou à l'alcool.

- Coloration :

- Couvrir le frottis avec une solution de cristal violet ou violet de gentiane et laisser en contact trente secondes à une minute.
- Rincer rapidement à l'eau pour enlever l'excès de colorant.
- Recouvrir de la solution de lugol et laisser agir pendant environ une minute, puis laver doucement à l'eau.
- Décolorer la lame avec le mélange alcool acétone, ensuite rincer soigneusement à l'eau.
- Recolorer le frottis avec la fuschine basique et laisser en contact pendant trente secondes (fuschine peut être remplacé par la safranine).
- Laver la lame à l'eau, sécher et examiner à l'immersion.

Lecture :

Les bactéries « Gram positives » sont celles qui après différenciation à l'alcool acétone, restent colorées en bleu, tandis que les bactéries « Gram négatives » prennent la coloration de contraste en rouge par la fuschine ou la safranine.

Les Escherichia coli sont « Gram négatives ».

c. Caractère biochimique :

- Galerie biochimique :

Elle sert à confirmer les suspicions :

➤ Préparation de la suspension bactérienne :

1. Mettre dans un tube à essai de l'eau physiologique. Avec l'anse de platine à boucle on prélève une colonie suspecte de la gélose BCP pour chaque organe.
2. Mettre la colonie dans l'eau physiologique et agiter le tube.
3. Laisser incuber une heure à 37°C dans l'étuve.

➤ Préparation de la galerie complète

1. Milieu TSI
2. mannitol mobilité
3. réaction urée indole
4. citrate de Simmons
5. réaction VP –RM
6. ONPG
7. ODC
8. LDC
9. Oxydase

I.2.3 Antibiogramme :

I.2.3.1 Méthode :

La méthode de disque (diffusion en gélose) est celle utilisée lors de notre expérimentation. Elle est fondée sur la fiche technique : « recommandation de institut pasteur selon les standard de l'OMS ».

➤ Milieu de culture :

Le milieu de culture Mueller Hinton (gélose non sélective) est celui utilisé pour étudier la sensibilité ou la résistance des bactéries envers les antibiotiques.

- Composition de la gélose Mueller Hinton : voir annexe.

Préparation de la gélose : La gélose en flacons est chauffée au bain marre, coulée en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm, puis laissée sécher 30 minutes à 37 °c avant son emploi.

- Les antibiotiques utilisés

Les disques d'antibiotiques conformes aux normes OMS sont commercialisés en cartouches de 50 disques

Préparation de l'inoculum :

Après isolement et identification de la bactérie *Escherichia coli*, elle est conservée et mise en culture sur gélose nutritive pour sa croissance.

- Racler à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, quelques colonies bien isolées.
- Décharger l'anse de platine dans 5 à 10 ml d'eau physiologique à 0,9%
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland, calculé à l'aide d'un densitomètre.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop dense.

Ensemencement :

- Il doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne de tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée séchée, en haut en bas en stries serrées
- Répéter l'opération 2 fois en tournant la boîte de 60° a chaque fois.

Application des disques d'antibiotique :

- Il ne faut pas mettre plus de 06 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre.
- Placer les antibiotiques dans les distributeurs manuels (05 antibiotiques)
- Mettre le distributeur à l'intérieur de la boîte de pétri, presser d'un coup sec sur le distributeur
- Retirer le distributeur et remettre le couvercle de la boîte de pétri.
- Laisser incuber à 37° c pendant 18 heures.

Lecture

On a mesuré avec précision le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse électronique. Ensuite on a comparé ces résultats aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture (tableau 16). Enfin on a classé les souches dans l'une des catégories : sensible(s), intermédiaire(I) ou résistante(R) pour chacun des antibiotiques testés.

Les catégories :

En générale la zone d'inhibition correspond à:

- Une bande brique : souche sensible (S)
- Une bande pointillée : souche intermédiaire (I)
- Une bande hachurée : souche résistante (R)

Interprétation :

- Une souche sensible est une souche qui peut être atteinte par un traitement à une dose habituelle par voie générale.
- Une souche intermédiaire est une souche qui peut être atteinte par un traitement local ou une augmentation de la dose.
- Une souche résistante est une souche qui ne répondra probablement pas, et ce quelque soit le type de traitement.

1.3 Contrôle de qualité:

Les souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 ont été testés dans les même conditions opératoires que celles des bactéries isolées a partir des volailles. Des antibiogrammes ont été réalisés une fois par mois pour cette souche.

Résultats et discussion

Tableau N°07 : Résumé de la galerie biochimique des souches isolées.

Caractères biochimiques	Escherichia coli
Lactose	+
Glucose + gaz	+
Saccharose	-
H ₂ S	-
Uréase	-
Indole	+
Mannitol mobilité	+
Catalase	-
Oxydase	-
Citrate de Simmons	-
β-galactosidase	+
Nitrate réductase	+
TDA	-
Phénylalanine désaminase	-
VP	-
RM	+
LDC	+

Tableau N°08 : Les résultats de diamètres des zones d'inhibition pour le contrôle de qualité pour la souche de référence *E. coli* ATCC 25922.

Echantillons	Colistine	Neomycine	Chloramph enicol	Acide nalidixique	Ampicillin e	Tetracyclin e
Valeurs normales	11 -12	17-25	15-21	22-28	16-22	18-25
E1	11.71	24.37	17.82	23.46	19.45	19.12
E2	11.32	22.86	19.78	27.56	18.46	19.54
E3	11.89	18.15	16.42	27.45	16.57	18.18
E4	11.52	17.93	17.51	23.43	18.98	23.11
E5	11.09	20.24	19.47	24.71	20.23	21.05

Echantillons	Enroflox acine	Nitrofur anoine	Trimethopr ime/sulfame thoxazole	Cephalotine	Cefotaxim e	Amoxicillin e+ acide clavulaniqu e
Valeurs normales	32-40	20-25	23-29	15-21	29-35	19-25
E1	32.66	23.44	25.27	16.25	33.35	22.13
E2	38.29	23.67	27.27	17.45	34.12	19.58
E3	37.12	24.11	24.53	17.89	30.86	22.85
E4	39.87	20.15	28.33	19.45	32.14	23.14
E5	36.84	22.14	28.53	20.06	30.25	24.00

Pour le contrôle de qualité, tous les résultats obtenus avec la souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 sont compris dans les valeurs limites des diamètres des zones d'inhibitions (voir annexe N°13), ce qui prouve la précision et la fiabilité de la technique adoptée ainsi que la performance des réactifs utilisés.

Tableau N°09 : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des souches isolées (en mm).

Diamètre des zones d'inhibitions (en mm).														
Echa ntillo ns	β lactamines				Tétra Cycline		Quinolones			Fur ane	Sulf ami des	Pol y Pep tide	ami nosi des	Phén icolés
	AM	AM C	CF	CXT / XNL	TE	OT	UB	EN R	NA	FT	SX T	CS	N	C
E1	25	14	23	41	13	12	18	20	12	19	7	18	22	23
E2	7	10	13	22	11	13	8	24	12	19	30	18	18	22
E3	22	8	19	16	20	23	18	22	9	24	24	22	24	27
E4	9	9	11	27	18	24	12	32	24	10	25	24	27	23
E5	7	8	10	26	10	10	10	14	7	20	7	22	9	28
E6	9	10	9	13	12	8	10	15	10	21	9	20	11	24
E7	7	8	8	25	26	24	22	8	11	23	21	20	23	27
E8	6	9	9	25	27	26	13	7	10	21	25	22	23	28
E9	7	9	16	24	12	9	7	14	10	17	7	19	13	25
E10	9	7	8	17	10	10	30	27	24	11	8	7	12	8

E11	8	7	9	22	14	17	13	21	10	13	8	20	18	19
E12	10	8	19	37	13	7	9	12	12	21	9	19	9	
E13	7	9	14	23	13	12	9	10	12	23	9	20	9	23
E14	8	10	14	34	9	10	30	30	23	22	7	20	8	23
E15	9	10	12	22	7	11	13	21	12	16	8	19	9	29
E16	7	10	15	35	12	11	14	22	11	20	9	21	11	11
E17	8	9	21	38	10	7	12	14	11	25	7	21	12	8
E18	8	7	16	16	8	9	29	15	22	20	9	19	10	26
E19	10	8	8	7	9	13	11	15	8	13	8	21	8	11
E20	9	9	13	20	13	10	10	10	10	18	8	19	22	10
E21	9	7	11	19	10	8	30	28	12	17	8	18	11	21
E22	8	8	11	31	12	8	23	17	15	19	7	18	22	10
E23	7	8	8	24	12	10	13	8	11	14	9	21	11	11
E24	9	9	12	36	11	13	10	13	7	20	8	20	11	7
E25	9	7	7	37	13	10	24	13	9	23	8	19	10	9
E26	7	10	9	32	10	9	19	10	10	12	9	19	8	19
E27	8	9	10	37	9	13	29	10	7	16	19	19	8	18
E28	10	8	11	34	7	7	21	17	13	18	7	18	22	9
E29	12	7	10	33	7	15	10	10	22	13	8	18	27	8
E30	7	7	13	35	8	8	13	12	22	12	9	20	10	29
E31	14	7	19	34	10	8	28	14	8	8	20	23	11	26
E32	9	7	18	28	12	10	13	21	8	20	7	21	8	10
E33	7	9	13	35	13	11	25	21	18	20	28	19	8	8
E34	8	8	19	34	11	13	14	17	12	11	8	19	15	27
E35	6	8	19	36	10	13	16	19	11	13	7	21	9	25
E36	8	8	10	15	7	10	13	14	7	18	8	21	9	8
E37	11	9	20	36	12	12	31	32	24	21	18	21	23	27
E38	7	7	19	36	8	11	12	17	10	17	9	19	23	7
E39	7	8	19	34	10	11	13	14	10	20	9	20	26	22
E40	9	9	9	37	9	9	15	18	31	21	19	19	23	11
E41	9	9	8	15	13	7	15	17	23	20	21	19	24	28
E42	9	8	19	40	9	12	29	31	22	23	27	20	22	28
E43	7	8	9	17	12	13	29	30	21	20	7	20	23	11
E44	8	7	18	38	10	13	31	31	10	26	27	21	25	9

Tableau N° 10: résultats des antibiogrammes par échantillon (selon les valeurs limites citées dans l'annexe, Tableau N° 14

Classement des échantillons (en R, I, S)														
β lactamines					Tétra cycline		quinolones			Fur ane	Sulf ami des	Pol y Pep tide	ami nosi des	Phén icolés
Echa ntillo ns	AM		CF	CXT / XNL	TE	OT	UB	EN		FT	SX		N	C
	AM	C						R	NA		T	CS		
E1	S	I	S	S	R	R	R	I	R	S	R	S	S	S
E2	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
E3	S	R	I	I	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
E4	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S
E5	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S
E6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S
E7	R	R	R	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S
E8	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
E9	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	I	S
E10	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
E11	R	R	R	S	I	I	R	I	R	R	R	S	S	S
E12	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
E13	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S
E14	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S
E15	R	R	R	S	R	R	R	I	R	I	R	S	R	S
E16	R	R	R	S	R	R	R	I	R	S	R	S	R	R
E17	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
E18	R	R	R	I	R	R	S	R	S	S	R	S	R	S
E19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
E20	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R
E21	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S
E22	R	R	R	S	R	R	I	I	I	S	R	S	S	R
E23	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R
E24	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
E25	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S	R	R
E26	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
E27	R	R	R	S	R	R	S	R	R	I	S	S	R	I
E28	R	R	R	S	R	R	I	I	I	S	R	S	S	R
E29	S	R	R	S	R	I	R	R	S	R	R	S	S	R
E30	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S

E31	I	R	I	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S
E32	R	R	I	S	R	R	R	I	R	S	R	S	R	R
E33	R	R	R	S	R	R	S	I	I	S	S	S	R	R
E34	R	R	I	S	R	R	R	I	R	R	R	S	I	S
E35	R	R	I	S	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S
E36	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
E37	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
E38	R	R	I	S	R	R	R	I	R	S	R	S	S	R
E39	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
E40	R	R	R	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	R
E41	R	R	R	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S
E42	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
E43	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
E44	R	R	I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R

Tableau N° 11 : Classement des échantillons selon leurs sensibilités vis-à-vis des antibiotiques.

	AM	AMC	CF	CXT/ XNL	TE	OT	UB	ENR	NA	FT	SXT	CS	N	C
résistance	40	43	26	6	39	38	29	21	30	10	31	1	23	19
sensible	3	0	13	34	3	4	11	9	11	31	13	43	19	25
intermédiaire	1	1	5	4	2	2	4	14	3	3	0	0	2	0

Tableau N°12: Pourcentage de sensibilité et de résistance d'Escherichia coli isolées chez la volaille.

	AM	AMC	CF	CXT/ XNL	TE	OT	UB	ENR	NA	FT	SXT	CS	N	C
Résistant(%)	90,9	97,7	59,1	13,6	88,6	86,4	65,9	47,7	68,2	22,7	70,5	2,27	52,3	43,2
sensible(%)	6,82	0	29,6	77,3	6,82	9,1	25	20,5	25	70,5	29,6	97,7	43,2	56,8
intermédiaire(%)	2,28	2,27	11,4	9,09	4,54	4,54	9,1	31,8	6,82	6,82	0	0	4,55	0

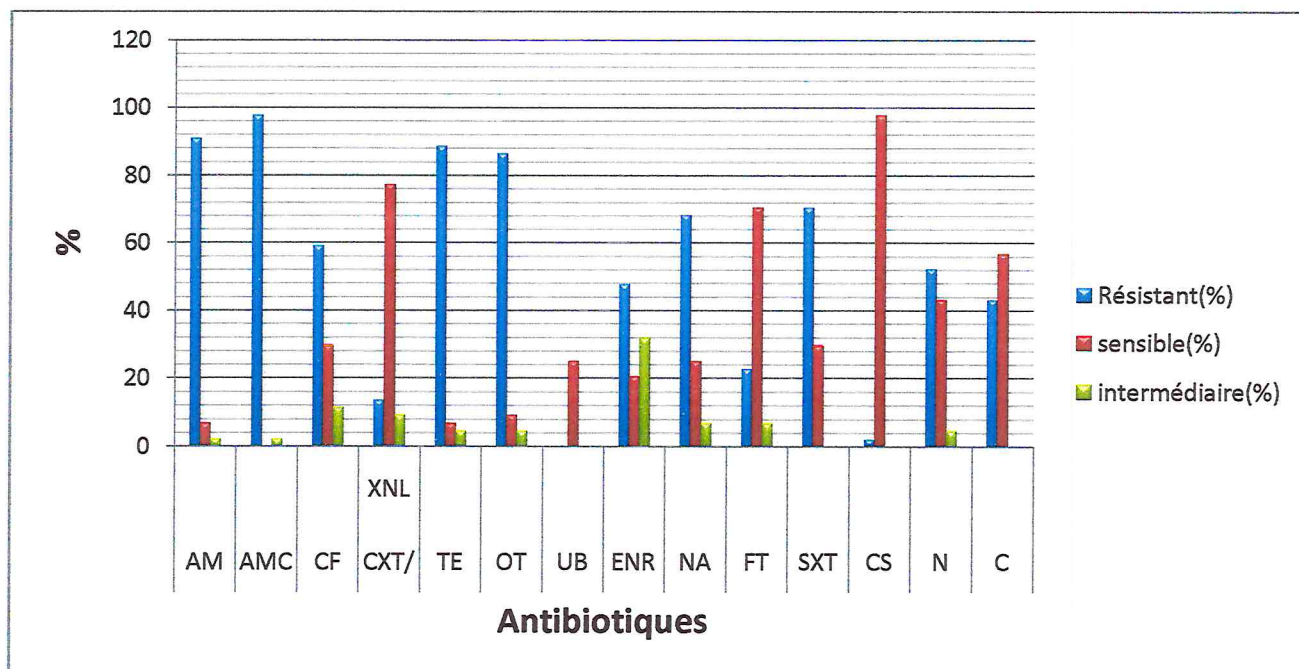


Figure n°01: Histogramme représentant le pourcentage de sensibilité et de résistance d'Escherichia coli isolées, aux antibiotiques.

Interprétation des résultats:

44 souches d'Escherichia coli ont été identifiées à partir des organes de volailles, sur la période allant de novembre 2010 jusqu'à mars 2011 ; puis soumises à un antibiogramme par méthode de diffusion sur gélose, selon les recommandations de l'institut Pasteur. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°09. Ensuite classer en catégorie sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R) (tableau N°10), selon leurs valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition (voir annexe tableau N°14). Enfin traduites en pourcentage de sensibilité et de résistance d'Escherichia coli isolées aux antibiotiques (tableau N°12).

Les β -lactamines :

D'une façon très schématique, les bêta-lactamines ; parmi lesquelles on peut distinguer les pénicillines et les céphalosporines sont des antibiotiques bactéricides qui agissent sur les bactéries en multiplication et en croissance.

Les pénicillines testées (ampicilline et l'association Amoxicilline+acide clavulanique) révélées non actives sur la grande majorité des souches identifiées avec des taux de résistance qui sont respectivement : 90.9%, 97.7%.

Par contre les céphalosporines testées (céfalotine, céfotaxime ou Ceftiofur) ont des activités très particulières sur les souches identifiées, dont le céfalotine de première génération n'est pas actif sur plus de la moitié des souches avec un pourcentage de résistance de 59,1%. Mais ceux de troisième génération (céfotaxime ou Ceftiofur) sont très efficaces et très actives sur la majorité des souches identifiées, avec un taux de sensibilité très élevé de 77,3%.

La synthèse des β -lactamases par la souche d'Escherichia coli peut signifier la résistance aux pénicillines testées.

Les tétracyclines :

Les souches d'Escherichia coli identifiées ont manifestées une résistance considérable aux tétracyclines testées (tétracycline et Oxytétracycline), avec des pourcentages de résistance qui sont respectivement : 88.6% et 86.4%.

La grande utilisation des tétracyclines en première intention à cause de leur spectre large peut signifier leur activité très réduite.

Les quinolones :

D'une façon générale les quinolones utilisées, parmi lesquels on peut distinguer celui de première génération (acide nalidixique), de deuxième génération (fluméquine) et celui de troisième génération (Enrofloxacin).

Les quinolones ont montrés les diamètres des zones d'inhibitions les plus intermédiaires avec des taux de résistance allant de 47.7% à 68.2%, c'est-à-dire : 47.7% pour Enrofloxacin, 65.9% pour fluméquine et 68.2% pour acide nalidixique. A rappelé que les quinolones sont habituellement actif sur les souches E coli, et que cette résistance s'accroît au fil de temps ce serai du encore une fois a leurs usage intensif dans les élevages avicoles.

Les furanes :

Dans cette famille la molécule utilisée est la nitrofurantoïne, par conséquence Escherichia coli est très sensible à cet antibiotiques, avec un pourcentage de 70.5%.

Cet antibiotique n'est utilisé que dans le cadre d'épidémiologie.

Les sulfamides :

La molécule utilisée dans cette famille est la sulfaméthoxazole associée à un diaminopyrimidines (Triméthoprime). Les souches isolées ont révélées une résistance très

La grande utilisation des sulfamides seuls ou associés en première intention à cause de leur spectre large peut signifier leur activité très réduite.

Polypeptides :

Le polypeptide utilisé est la colistine, par conséquence toutes les souches d'Escherichia coli isolées sont pratiquement sensible à cet antibiotique à l'exception d'échantillon 10, avec un pourcentage de 97,7%.

Aminosides :

Dans cette famille l'antibiotique utilisé est la néomycine, selon Gogny et Puyt (2001), la résistance bactérienne se développe rapidement contre cet antibiotique, en effet les souches d'Escherichia coli identifiées sont plus au moins résistantes, avec un taux de résistance de 52,3%.

Les Phénicolés :

Le chloramphénicol est l'antibiotique utilisé dans cette famille, sachant qu'il est interdit chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine. Mais recommandé par l'OMS dans le cadre de l'épidémiologie.

Par conséquence les souches d'Escherichia coli sont plus ou moins sensibles à cet antibiotique, avec un taux de sensibilité de 56,8%.

Discussion:

L'antibiogramme par la méthode de diffusion sur gélose a révélé les résultats suivants :

Les pénicillines (ampicilline et l'association Amoxicilline+acide clavulanique) ont montré les résistances les plus importantes, respectivement 90.9%,97.7%, légèrement supérieurs a ceux obtenus par les laboratoires du réseau algérien de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (édition 2009, 10^{ème} rapport) 82% et 60.7%.

Presque la totalité des isolats analysés sont résistants aux tétracyclines (88.6%). Hammoudi Abdelhamid avait rapporté le même résultat (87%) en 2009 dans la région ouest algérienne.

Des taux élevés de résistance (70% des souches résistantes aux sulfamides). Cette antibiorésistance est alarmante. A rappelé que Hammoudi Abdelhamid n'avait rapporté que 49%. En effet la grande utilisation des sulfamides seuls ou associés en première intention et la présence sur le marché de plusieurs génériques dans ces derniers temps peut justifier l'accroissement rapide et significatif de cette résistance.

La résistance aux quinolones est variable selon les différentes molécules de cette famille d'antibiotiques, allant de 47.7% pour l'enrofloxacin à 68% pour l'acide nalidixique passant par 65.9% pour la fluméquine. Le réseau algérien de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (édition 2009, 10^{ème} rapport [31]) avait rapporté 60% pour enrofloxacin et 63% pour l'acide nalidixique.

Une faible résistance pour La colistine et la céfotaxime avec un taux de 2.27%et 13.6% respectivement.

Une résistance non négligeable pour les furanes et les phénicoles respectivement 22.7% et 43% .malgré l'interdiction de leur usage en médecine vétérinaire. Cela est du peut être à un usage frauduleux.

Nous savons que dans la majorité des cas pendant la période d'élevage, les éleveurs de volailles administrent les antibiotiques sans prescription médicale aux oiseaux dans l'aliment ou dans l'eau de boisson.

L'utilisation intensive et répétée des antibiotiques dans l'alimentation comme facteur de croissance, dans la prévention et la thérapeutique contribue à la sélection des germes résistants dans l'espèce aviaire.

Ainsi notre étude aurai contribué à la prescription de la colistine comme molécule de choix pour la thérapeutique anti-coli bacillaire digestives aviaires, étant données que les souches isolées ont présentées une sensibilité assez remarquable. Une association avec l'érythromycine est préconisée par certains auteurs (Arnaud Ginette, Caudron Clémentine).

Conclusion et recommandations

La résistance bactérienne aux antimicrobiens se traduit cliniquement par des échecs thérapeutiques rendant le choix de la molécule ardu. En effet, Le test de sensibilité « l'antibiogramme » permet d'évaluer *in vitro* l'efficacité de ces molécules, classant la bactérie comme sensible, résistante ou de sensibilité intermédiaire pour chaque antibiotique testé.

L'étude des antibiogrammes des *Escherichia coli* d'origine avicole a met en évidence une grande variation dans la diffusion de la résistance acquise. Les données de la partie expérimentale montrent une évolution significative dans le temps du pourcentage de souches résistantes à des antibiotiques très utilisés tels que les tétracyclines et les quinolones. Une cinétique de résistance significative a été signalée pour les sulfamides.

Il faut admettre que les éleveurs administrent des antibiotiques, juste après l'apparition des premiers symptômes, soit suite à une prescription déraisonnée soit à titre frauduleux, même avant l'envoi au laboratoire.

En synthèse, il est impérativement recommandé aux praticiens le recours au laboratoire pour un diagnostic de certitude de la pathologie suspectée, avant d'envisager le schéma thérapeutique. Un antibiogramme associé permet d'orienter le choix de la molécule à prescrire. Il est également conseillé d'alterner les molécules quant ceci est possible.

Il est souhaité d'installer des comités d'épidémiosurveillance spécialisé pour chaque germe dont la cinétique de résistance est hâtive.

Enfin dans l'attente de nouvelles molécules antibactériennes et afin de mieux maîtriser cette résistance chez l'animal et d'éviter ses conséquence chez l'Homme, il impérativement recommandé de laisser en exclusivité certaines molécules pour l'usage humain.

Annexe

1. Verrerie et appareillage

- Réfrigérateur, congélateur
- Etuves de 37 °c et de 35°c
- Microscope optique
- Bec benzène
- Boites de pétri
- Pipettes pasteur et Anse de platine
- Tubes à essai et flacons
- Ecouillons
- Lames et lamelles
- Ciseaux et Pinces métalliques
- Densitomètre Mac Farland
- Agitateur a tubes
- Bain marie
- Distributeur des disques d'antibiotiques
- Paillasse
- Papier aluminium
- Balance
- Autoclave et four pasteur
- Pied à coulisse électronique
- PH mètre
- Thermomètre

2. Les milieux solides

2.1 gélose nutritive :

La gélose nutritive est un milieu qui convient à la structure des germes ne présentant pas d'exigences particulière.

Formule : (en g/l d'eau distillée)

• peptone.....	5	
• extrait de viande.....	1	
• extrait de levure.....	2	pH = 7.4
• chlorure de sodium.....	5	
• agar	15	

Préparation :

- verser 28g dans un litre d'eau distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à dissociation complète.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

2.2 gélose Hektoen :

La gélose Hektoen est un milieu utilisé pour l'isolement des entérobactéries. Il permet la différenciation des entérobactéries pathogènes.

Formule : (en mg/l d'eau distillée)

• protéines peptone.....	12	
• extrait de levure.....	3	
• chlorure de sodium.....	5	
• sels biliaries.....	5	
• thiosulfate de sodium.....	9	
• citrate de fer ammoniacal.....	1.5	pH = 7.5
• salicine.....	2	
• lactose.....	12	
• saccharose.....	12	
• fuschine acide.....	0.1	
• bleu de bromothymol.....	0.065	
• agar	14	

Préparation :

- Verser 76mg de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Chauffer légèrement et laisser bouillir quelques secondes.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir à 60°C et couler en boites de pétri.

2.3 Gélose TSI : (gélose glucose – lactose – saccharose – H₂S)

La gélose TSI est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries. Ce milieu permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement du gaz) du saccharose et de la production d'hydrogène sulfureux (H₂S).

Formule : (en g/l d'eau distillée)

• peptone.....	20	
• extrait de viande.....	3	
• extrait de levure.....	3	
• chlorure de sodium.....	5	
• citrate ferrique.....	0.3	
• thiosulfate de sodium.....	0.3	pH = 7.4
• lactose.....	10	
• saccharose.....	10	
• glucose.....	1	
• rouge de phénol.....	0.5	
• agar.....	12	

Préparation :

- Verser 60g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Bien mélanger et répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Incliner les tubes de façon à obtenir un culot de 3 cm de hauteur.

2.4 Milieu mannitol – mobilité :

Ce milieu est utilisé pour la différenciation rapide des entérobactéries. Il permet de rechercher simultanément, la mobilité et l'utilisation du mannitol.

Formule : (en g/l d'eau distillée)

• Peptone trypsine.....	20
• Gélose.....	4.5
• Mannitol.....	2
• Nitrate de potassium.....	1.5
• Rouge de phénol à 1%.....	4ml
• Eau.....	1000ml

Préparation :

- Mettre 28g de milieu déshydraté.
- Attendre 5 minutes puis, mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

- Chauffer lentement en agitant fréquemment puis porter à l'ébullition jusqu'à complète dissolution.
- Ajuster si nécessaire le pH à 8.1 à 8.2.
- Repartir en tubes de façon à obtenir un culot de 6 à 7cm.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

2.4 Milieu au citrate de Simmons :

C'est un milieu solide utilisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif. Il permet de rechercher de l'utilisation de citrate de sodium comme seule source de carbone.

Formule : (en g/l d'eau distillée)

• sulfate de magnésium.....	0.2	
• citrate de sodium.....	2	
• chlorure de sodium.....	5	
• phosphate d'ammonium monosodique.....	0.8	pH = 7
• phosphate d'ammonium.....	0.2	
• bleu de bromothymol.....	0.08	
• agar.....	15	

Préparation :

- Verser 23g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Mélanger en agitant fréquemment.
- Chauffer et laisser bouillir pendant une minute.
- Répartir en tubes et stériliser à 121°C pendant 15 minutes.
- Refroidir en position inclinée pour obtenir une pente longue.

3. Les milieux liquides

3.1 Bouillon nutritif :

Le bouillon nutritif est un milieu liquide qui permet la croissance des germes, ne présentant pas d'exigences particulières.

Formule : (en g/l d'eau distillée)

• Peptone.....	5	
• extrait de viande.....	1	pH=7.4
• extrait de levure.....	2	
• chlorure de sodium.....	5	

Préparation :

- Verser 13 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Bien mélanger et répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3.2 L'eau peptonnée : exempte d'indole : c'est un milieu liquide qui permet la croissance des germes, ne présentant pas d'exigences particulières. Elle est surtout utilisée pour la recherche de la production d'indole.

Formule : (en g/l d'eau distillée)

- Peptone exempte d'indole..... 10
 - Chlorure de sodium..... 5
- pH=7.2

Préparation :

- Mettre 15 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée.
- Mélanger soigneusement jusqu'à complète dissolution.
- Ajuster, si nécessaire, le pH à 7.2.
- Répartir puis stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

3.3 Milieu Clark et Lubs :

Ce milieu sert à l'étude de deux réactions :

- Réaction de rouge de méthyle (RM)
- Réaction de Vogé – Proskauer

Elles sont utilisées en particuliers dans la différenciation des entérobactéries.

La réaction VP positive est caractéristique de certaines bactéries lorsqu'il y a présence d'acétyl-méthyle carbinol (acétoïne) dans le milieu, ce composé est un produit de dégradation de l'acide pyruvique.

La réaction de RM consiste à une mesure du pH du milieu, en effet, de nombreuses bactéries produisent des composés organiques acides à partir de l'acide pyruvique.

Formule : (en g/l d'eau distillée)

- Peptone de white..... 5
 - Glucose 5
 - Phosphate de potassium..... 5
 - Eau distillée..... 1ml
- pH = 7.5

Préparation :

- Dissoudre 15 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Mélanger soigneusement pour obtenir une dissolution complète.
- Ajuster le pH à 7.5 environ.
- Répartir à raison de 10 ml/tube.
- Stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

3.4 Milieu urée-indole :

Ce milieu permet de rechercher l'uréase qui est une urée amidon – hydrolyse :



L'hydrolyse se traduit par une alcalinisation du milieu due à la formation de NH_3 .

Formule : (en g/l d'eau distillée)

- L-tryptophane 0.3
- Phosphate monopotassique..... 0.1
- Phosphate dipotassique..... 0.1
- Chlorure de sodium..... 0.5
- Urée..... 2
- Alcool à 95°..... 1ml
- Rouge de phénol à 1%..... 0.25ml
- Eau distillée 1ml

Préparation :

- Dissoudre le tryptophane dans l'eau chauffée à 80°C.
- Ramener à 50° et ajouter le reste des ingrédients.
- Après dissolution, stériliser le milieu par filtration stérilisante.
- Répartir en ampoules ou en tubes stériles.

3.5 Milieu de Moeller : (bouillon pour l'essai de l'ornithine, lysine, arginine)

Formule : (en g/l d'eau distillée)

- Peptone spéciale..... 5
- Extrait de viande de bœuf 5
- Pyridoxal.....
..... 0.005
- Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 1p 500..... 5 ml
- Solution aqueuse de rouge de crésol à 1p 500..... 5 ml
- Glucose.....
... 0.5

Préparation :

- Dissoudre l'ensemble des ingrédients dans un litre d'eau distillée et ajuster le pH à 6.
- Ajouter 1% de L-lysine, ou L- arginine ou de l'ornithine selon la préparation envisagée.
- Réajuster le pH après addition des acides aminés.

- Répartir à raison de 3 à 5 ml par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 120° C pendant 10 minutes.
- Un léger précipité peut se former dans les tubes renfermant de l'ornithine, sans perturber les réactions.

3.6 Bouillon nitraté :

Le bouillon au nitrate est utilisé pour la recherche d'une nitrate réductase (NR) chez les bactéries (réduction du nitrate en nitrite soit en azote).

Formule : (en g/l d'eau distillée)

- Infusion cerveau- cœur 25
- Nitrate de potassium 10 pH final = 7.2 + ou - 0.
- Eau distillée..... 1000 ml

Préparation :

- Dissoudre complètement 16.5 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Répartir et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3.7 Milieu de Carlquist :

Formule : (en g/l d'eau distillée)

- peptone pancréatique de caséine..... 15
- phosphate dipotassique..... 2
- glucose..... 1
- eau distillée..... 1000 ml

3.8 Milieu pour la recherche de la phénylalanine désaminase :

Formule : (en g/l d'eau distillée)

- Peptone 10
- phosphate bipotassique..... 1
- Chlorure de sodium.....5
- Extrait des levures 3
- D-L phénylalanine 2
- Agar..... 12
- Eau distillée..... 1000 ml

Tableau N° 13: Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité. [31]

Antibiotiques testés	Charge des disques	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Ampicilline	10µg	16-22
Amoxicilline+ acide clavulanique	20/10µg	19-25
Acide nalidixique	30µg	22-28
Ceftazidime	30µg	—
Cephalothine	30µg	15-21
Cefotaxime	30µg	29-35
Cefoxitine	30µg	—
Ceftiofur	30µg	26-31
Cephalotine	30µg	15-21
Colistine	10µg	11 -12
Clindamycine	2µg	—
Chloramphenicol	30µg	21-27
Erythromycine	15µg	—
Enrofloxacin	5µg	32-40
Furanes	300µg	20-25
Gentamicine **	10µg	19-26
Neomycine	30µg	17-25
Norfloxacin	5µg	28-35
Oxacilline	1µg
Pénicilline	10UI
Spectinomycine	100µg	21 -25
Trimethoprim/sulfaméthoxazole	1,25/23.75µg	23-29
Tétracycline	30µg	18-25
Tilmicosine	15µg	—
Vancomycine	30µg	—

May 2004 et tableau extrait du Document M100 – S16. Vol. 26, n°3. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement.

- Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. CLSI : Document M31-S1- Vol.24 N°.17
- ** Pour tester les disques de gentamicine 120µg, il faut utiliser la souche de référence *Enterococcus faecalis* ATCC29212 : (Gentamicine (16 – 22 mm)).

Tableau N°14 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries* chez toutes les espèces animales. [31]

Conditions du test :

Milieu : Gélose Mueller- Hinton.

Inoculum : Colonies en suspension, 0,5 Mc Farland 18h.

Contrôle de qualité : *Escherichia coli* ATCC 25922.

Incubation : 35°C, atmosphère ordinaire.

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (Mg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
β-lactamines						
Ampicilline	10ug	<13	14-16	>17	>32	<8
Amoxicilline+ ac.clavulanique**	20/10ug	<13	14-17	>18	> 32/16	< 16/8
Ceftiofur**	30ug	<17	18-20	>21	> 8	<4
Cephalothine	30ug	<14	15-17	>18	> 32	<8
Aminosides						
Néomycine	30ug	<13	14-17	>18	> 64	<16
Sulfamides						
Trimethoprime/sulfamethoxazole	1.25/23.75ug	<10	11 -15	>16	>4/76	<2/38
Tétracyclines						
Tétracycline	30ug	<14	15-18	>19	>16	<4

Quinolones						
Acide nalidixique	30ug	<13	14-18	>19	>32	<8
Norfloxacine	10ug	<12	13-16	>17	>16	<4
Enrofloxacin						
Toutes espèces animales	5ug	<16	17-22	>23	>4	<0,5
Aviaire (E.coli)	5ug	<16	17-22	>23	>2	<0,25
Bovine	5ug	<16	17-20	>21	>2	<0,25
Polypeptides						
Colistine	10ug	<10	11 -12	>13	-	-
Furanes						
Nitrofurantoin***	300ug	<14	15-16	>17	> 128	<32
Phenicolés						
Chloramphénicol ***	30ug	<12	13-17	>18	>32	<8

May 2004 et tableau extrait du Document M100 – S16. Vol. 26, n°3. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement.

- Performance standards for antimicrobial susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standards – Second Edition. CLSI: Document M31-A2- Vol.24 N°17
- ** Antibiotique testé seulement pour la recherche de la β - lactamase.
- *** Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiologie

Liste des abréviations

AGP:	antibiotic growth promotors
AM:	ampicilline
AMC:	Amoxicilline + acide clavulanique
ARF:	antibiotiques régulateurs de flore
ATB:	antibiotique
BCP:	Pourpre de Bromochrisole
C:	Chloramphénicol
CF:	Cephalothine
CMI:	concentration minimale inhibitrice
Cs:	Colistine
CTX:	Céfotaxime
DBK:	Draa Ben Kheda
ENR:	Enrofloxacin
FT:	Nitrofurantoine
I:	Intermédiaire
IBV:	virus de la bronchite infectieuse
LDC:	décarboxylation de la lysine
N:	Néomycine
NA:	Acide nalidixique
NDV:	virus de la maladie de Newcastle
ODC:	ornithine décarboxylase
OMS:	organisation mondiale de la santé
OT:	Oxytétracycline
R:	Résistante
RM:	rouge de méthyle
S:	Sensible
SXT:	Triméthoprime + sulfaméthoxazole
T:	Tétracycline
TDA:	détection du tryptophane désaminase
UB:	Fluméquine
VP:	Vogue-Poskauer
XNL:	Ceftiofur

LISTE DES TABLEAUX

- **Tableau N°01** : les principaux caractères permettant l'identification d'*E. coli*
- **Tableau N°02** : Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine
- **Tableau N°03** : Les molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire
- **Tableau N°04** : Principaux antibiotiques utilisés en aviculture
- **Tableau N°05** : les prélèvements effectués
- **Tableau N°06** : liste des antibiotiques testés à DBK
- **Tableau N°07** : Résumé de la galerie biochimique des souches isolées
- **Tableau N°08** : Les résultats de diamètres des zones d'inhibition pour le contrôle de qualité pour la souche de référence *E. coli ATCC 25922*.
- **Tableau N°09**: Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des souches isolées
- **Tableau N°10** : Résultats des antibiogrammes par échantillon
- **Tableau N°11** : Classement des échantillons selon leurs diamètres d'inhibition vis-à-vis des antibiotiques
- **Tableau N°12**: Pourcentage de sensibilité et de résistance d'*Escherichia coli* isolées à partir de volailles
- **Tableau N°13** : Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité
- **Tableau N°14** : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries* chez toutes les espèces animales

LISTE DES FIGURES

- **Figure N°01** : Histogramme représentant le pourcentage de sensibilité et de résistance d'*Escherichia coli* isolées aux antibiotiques

LISTE DES REFERENCES

1. Andreu et Mainardi, J-K. (2003). La revue du praticien : que doit-on connaitre de la microbiologie pour prescrire un antibiotique ? N° : 53.
2. AVRIL. J.L, DABERNAT. H, DENIS. F, MONTAIL.H. (2000). Bactériologie clinique, p : 175-181.
3. BAINS, B.S. - Colibacillosis. - in A manuel of poultry diseases. Ed Roche, sle,1979; 81-83.
4. BERGOGNE.E, BEREZIN, BROGARD J.M (1999). Base biologique de l'antibiothérapie. Edition MASSONI.P, p : 20-41 275-283.
5. Bezoen. A, Van Haren. W, Hanekamp. J-C (1999). Human Health and Antibiotic Growth Promotors (AGPs): Reassessing the Risk. Heidelberg Appeal Nederland studies. <http://www.stichting-han.nl/english/studies.html> (Consulté le 11-10-2010)
6. Bryskier A, (1999). Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Edition Marketing chez Ellipses : 2116p.
7. CHASLUS-DANCLA E. (1999). Mécanismes de résistance aux antibiotiques. *In : Journées Nationales GTV-INRA*. Nantes, 26-28 Mai 1999, Groupements Techniques Vétérinaires, 1999, 133-137.
8. Chatellet. M-C (2007). Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou, page 9-90. Thèse de docteur vétérinaire, École nationale vétérinaire d'ALFORT.
9. CLOUD, SS, ROSENBERGER, JK, FRJES, P.A, WILSON, RA and ODOR, EM. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I.Serotypes, metabolic activity and antibiotic sensitivity. *Avian diseases*, 1986;**29**, (4): 1084-1093.
10. Colatrella. M-O (2000). Maladies des bovins, 3eme édition. Chapitre VIII les médicaments, page 46.
11. COURVALIN. P, PHILIPPON. A, (1990). Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens.
12. DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 1999; **30**: 299-316.

13. DHO-MOULIN, M. - Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. Ann. Méd. Vét., 1993; **137**: 353-357.
14. GOMIS, SM., WATTS, T., RIDDELL, C, POTTER, AA and ALLAN, B.J
Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. Avian diseases, 1997;**41**:234-240.
15. Grimont, P. 1987. Taxonomie des *Escherichia*. Méd Mal Infect, 6-10.
16. GROSS W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: GYLES C.L. (Eds), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab international: Wallingford, 1994;237-259.
17. GROSS.W.B. CALNEKB.W.,BARNES H.J.,BEARD C.W.,REIDW.M.:
Colibacillosis. Disease of poultry 9th ed .Anes: Iowa state University Press.1991, 138 - 144
18. GUERIN J. ., BOISSIEUC. Les colibacilloses ou infections à *Escherichia coli* Avi campus : Dernière mise à jour : 30.06.08
19. Guillemot. D (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, page 10-214. (AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).
http://www.cndwebzine.hcp.ma/cnd_si/MG/pdf/35821/35822pdf. (Consulté le 20-01-2011).
20. Jacquemin. F (2006). Viandes : Après les hormones, les antibiotiques.
<http://pagesperso-orange.fr/alps08-carignan/viandes.htm#haut> (Consulté le 20-02-2011)
21. JEFFREY J.S., NOLAN L.K., TONOOKA K.H. , WOLF.S.,GIDDINGS C.W.,HORM S.M., FOLEY S.L.,LYNNE A.M., EBERT J.O ELIJAH L.M.,jorklund g.b. ,pfaff s.j., DONOUGH M.C.,SINGER R.S. and DOETKOTT C. Virulence factors of E coli from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. Avian Dis : 2002; **46** : 48 – 52
22. JORDAN F.T.W., PATTISON M. Poultry diseases. W. B. Saunders Company: London, 1996; 38-43.
23. KEMPF, L, GESBERT, F., GUITTET, M. et BENNEJEAN, G - Mise au point d'un modèle expérimental de colibacillose chez le canard de Barbarie. Revue Mid Vét., 1993, **144** (10):767-772

24. Kirkpatrick. D (2002). L'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation : les conséquences pour la résistance et la santé humaine, page-17-229.
25. Korsak, N., A. Clinquart, G. Daubes. *Salmonella* spp dans les denrées alimentaire d'origine animale: un réel problème de santépublique. *Ann. Méd. Vét.* 200.148:174-193.
26. LECLERC Henri, (1969). Microbiologie tome I, p : 240-249.
27. LECOANET. J.: Colibacilloses aviaires. Dans manuel de pathologie aviaire, imprimerie du cercle des élèves de l'école vétérinaire d'Alford .Ed par J.BRUGERE PICOUX et A. SLIM. 1992: 237 – 240
28. Léon LE MINOR, Michel VIRON, (1989). Bactériologie médicale chapitre II.
29. Messai. A (2006). Analyse critique des pratiques de l'antibiothérapie en élevages avicoles, page 5, 26-27. Thèse de magistère département des sciences vétérinaires d'El Khroub, Université de Mentouri Constantine (UMC).
30. MONROE A.D.,LATIMER K.S.,PASTI G.M and BAKALI R.I. Bacteriophage treatment of a severe E.Coli respiratory infection in broiler chickens. *Avian Dis* : 2003; **47** : 1399 – 1405.
31. Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale, 4^{ème} édition 2008, selon les recommandations de l'OMS p : 47-50, 72 et 82.
32. PAKPINYO S, LEY D.H., BARNES H.J.,VAILLANCOURT J.P and GUY J.S. Prevalence of entero pathogenic E.Coli in naturally occurring cases of poultry enteritis mortality syndrome. *Avian Dis* : 2002; **46** : 360 – 369
33. POURBAKSH, SA, BOULIANNE, M, MARTINEAU-DOIZE, B., DOZOIS, CM, DESAUTELS, C and F AIRBROTHER J M - Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens, - *Avian Diseases*, 1997 b; **41**:221 - 233.
34. Pujol-Dupuy. C (2004). Accidents alimentaires d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et Produits laitiers, page 38-39. Thèse de docteur vétérinaire de l'école nationale Vétérinaire de Lyon.
35. Roussel-Delvallez M. (2001). Bactériologie multirésistante : doit-on rester optimiste ? *Feuille de biologie.* 42, n°238.

36. ROUVEIX.B, (1990). Médicaments en pathologie infectieuse. Edition MASSON. P : 5-7 et 78.
37. SALVADORI M.R., YANO T., CARVALHO H.F., PARREIRA V. R., GYLES C.L. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis.2001;45: 43-51.
38. SCHWARZ S., CHASLUS-DANCLA E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet.Res. 2001, 32, 201-225.