

**UNIVERSITE DE BLIDA 1**  
**Institut des Sciences Vétérinaires**

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

En sciences vétérinaires

Spécialité : microbiologie médicale des maladies zoonotiques

**ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ESCHERICHIA COLI  
PATHOGENES D'ORIGINE AVIAIRE, SEROTYPAGE ET  
RECHERCHE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES**

Par

**Zehor HALFAOUI**

Devant le jury composé de :

R. TRIKI YAMANI	Maitre de conférences A, U. Blida	Président
N. SAHRAOUI	Maitre de conférences A, U. Blida	Examinatrice
K. Ait OUDHIA	Maitre de conférences A, ENSV H	Examinatrice
M. BACHIR PACHA	Professeur, U. Blida	Examineur
M.N. MENOUEI	Maitre de conférences A, U. Blida	Promoteur

Blida, Juin 2015

## RESUME

La bactérie *Escherichia coli* est considérée comme une bonne indicatrice de la pression de sélection exercée par les antibiotiques, et de la résistance ; elle est responsable d'une maladie redoutable chez l'espèce aviaire, de part les pertes économiques qu'elle cause, c'est la colibacillose.

Un total de 156 souches d'*Escherichia coli* ont été isolées à partir d'organes de poulets de chair présentant les lésions de colibacillose, dans la région de Ain Defla. Ces souches ont été sérotypés et testés vis-à-vis de 13 antibiotiques.

Le sérotypage a montré que 50 souches appartiennent aux trois sérotypes testés (23 pour O1, 11 pour O2 et 16 pour O78), ce qui représente 32% des isolats, les 103 restantes n'appartiennent pas à ces trois sérotypes.

Les antibiogrammes ont montré de hauts niveaux de résistance pour l'oxytétracycline (94.12%), suivie de la fluméquine avec 91.50%, sulfamethoxazole+triméthoprim (88.89%), enrofloxacin (86.27%), acide nalidixique (85.62%), ampicilline (83.01%), et doxycycline (75.81%). Des niveaux moyens de résistance pour le chloramphénicol (39.22%) et amoxicilline + acide clavulanique (43,13%). Pour la céfotaxime, 153 souches sont sensibles, les 3 souches restantes présentent des profils de  $\beta$ - lactamases à spectre élargi

Par ailleurs, l'analyse de la multirésistance a révélé que toutes les souches sont résistantes à au moins 2 antibiotiques.

Cette résistance représente un danger pour la santé animale et humaine, sachant que l'antibiothérapie reste le seul moyen pour contrôler la colibacillose.

Mots clés : *Escherichia coli*, poulet de chair, colibacilloses, sérotypage, antibiorésistance

## ملخص

تعتبر البكتيريا "إشيريشيا كولي" كأحسن دليل للضغط الناتج عن استعمال المضادات الحيوية و مقاومتها إنها تؤدي إلى مرض مهم عند الدواجن من حيث الخسائر المادية التي تنتج عنها و هي الكوليباسيلوز.

تم عزل 156 بكتيريا الكوليفورم على أجسام الدجاج اللاحم المصاب بالكوليباسيلوز في ولاية عين الدفلى، هذه البكتيريا تم فصلها و دراسة مقاومتها لثلاثة عشر مضاد حيوي أثبت اختبار الفصائل أن 50 وحدة تنتمي لواحد من الفصائل (O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>78</sub>) و هذا يمثل 33% من الوحدات البكتيري، أما 106 لا تنتمي للفصائل الثلاثة.

أثبت اختبار المقاومة وجود مقاومة مكثفة للأكسيتتراسكلين (94,12%) ، متبوعة بالفلومكين (91.50%)، سولفاميد و تريمثوبريم (88.89%)، أنروفلوكساسين (86.27%)، أمبسيلين (83.01%)، أسيد ناليديكسيك (85.62%) و الدكسيسكلين (75.81%) مقاومة متوسطة للأمكسيسيلين و أسيد كلفولنيك (43.13%) و كلورومفنكول (39.22%).

فيما يخص سيفوتاكسيم، كل البكتيريا غير مقاومة إلا ثلاثة، التي أظهرت الإنزيمات ذات المفعول الممتد ضد البييتلاكتام. من جهة أخرى، نتائج تعدد المقاومات أظهرت أن كل الوحدات مقاومة لمضادين حيويين على الأقل.

هذه المقاومة تمثل خطر للصحة العمومية، بالعلم أن المضادات الحيوية تبقى الحل الوحيد للحد من مرض الكوليباسيلوز.

الكلمات المفتاحية : إشيريشيا كولي، مقاومة للمضادات الحيوية، اللدجاج اللاحم.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is considered as a good indicator for selection pressure by antibiotic use and for resistance problems to be expected in pathogens, it cause a major health concern in poultry ; the colibacillosis, witch represent one of the most important economic losses in the poultry industry

A total of 156 strains of *E.coli* were isolated from broilers with colibacillosis lesions in Ain defla town, these strains were serotyped and tested over 13 antibiotics

Serotyping showed that 50 strains belong to 3 serotypes (O1, O2, O78) witch represent 32% of isolates

The antimicrobial susceptibility test, showed high level of resistance to oxytetracyclins (94.12%), flumequine (91.5%), sulfamethoxazole-trimethoprim (88.89%), enrofloxacin (86.27%), nalidixic acid (85.62%), ampicillin (83.01%) and doxycyclin(75.81%), medium level resistance to chloramphenicol(39.22%) and amoxicilline- clavulanic acid (43.13%)

All the strains were susceptible to cefotaxime, excepting three, witch present an extended spectrum  $\beta$ -lactamase

In addition, the results of multiresistance showed that all the strains are resistant to at least 2 antibiotics

Antibiotic resistance represent a threat for public health and Antibiotics belong the only main to control colibacillosis

Key words : colibacillosis, antibiotic resistance, *Escherichia coli*, broilers, serotyping

## REMERCIEMENTS

A Dr Menoueri, mon promoteur, pour m'avoir proposé ce sujet et pour ses précieux conseils et ses critiques constructives

A mon co-promoteur, Dr Bendali Lyes, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, pour ses conseils et sa présence, et à son personnel pour m'avoir aidé à mener au mieux mon travail au laboratoire

A Dr Triki Yamani, pour m'avoir fait l'honneur d'être mon président de jury. Sincères remerciements

A Dr sahraoui, pour avoir accepté de faire partie du membre du jury. Sincères remerciements.

A Pr Bachir Pacha pour avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie du membre de jury. Mes remerciements

A Dr Ait oudhia, pour avoir accepté de participer à mon jury de mémoire. Sincères remerciements

A Dr Sebaa Fatima, pour son encouragement et sa compréhension tout au long de la préparation de mon magister, je lui suis très reconnaissante

A Dr mouzaika, Dr becetti, pour m'avoir aidé à réaliser les prélèvements et pour leurs conseils

A tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce mémoire, ils se reconnaîtront

## DEDICACES

A mes parents, partis trop tôt pour que je puisse leur exprimer, à juste titre, mon incommensurable gratitude. Ils m'ont tout appris, que dieu les garde dans son vaste paradis

A mon mari, Farouk, qui m'a soutenu dans les moments les plus difficiles, pour ses encouragements et ses concessions

A mon bébé, mon ange, ma lumière et ma source de courage, Adam

A mes sœurs, toutes m'ont aidé chacune à sa manière, que dieu nous laisse unis pour toujours

A mes beaux frères Fatah et Lyes pour leur implication, leurs conseils et leur présence

A ma tante Bahia et à son défunt mari. Que dieu le garde dans son vaste paradis

A Faiza Kelkoui, qui sait toujours trouver le mot juste, pour m'encourager.

A toute ma famille et ma belle famille.

## TABLE DES MATIERES

RESUME.

REMERCIEMENTS.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	11
1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	13
1.1. Historique.	13
1.2. Généralités sur les entérobacteriaceae.	13
1.3. Habitat.	13
1.4. Caractères morphologiques.	14
1.5. Caractères cultureux.	14
1.6. Caractère biochimiques.	14
1.7. Caractères antigéniques.	14
1.8. Pouvoir pathogène chez l'homme.	15
1.9. Pouvoir pathogène chez l'espèce aviaire.	19
1.9.1. Pathogénie.	19
1.9.2. Les manifestations cliniques de la maladie.	20
1.9.3. Facteurs de virulence.	23
1.10. Diagnostic.	29
1.11. Traitement.	31
1.12. Prévention.	31
2. LES ANTIBIOTIQUES.	32
2.1. Définition.	32
2.2. Historique.	32
2.3. Classification des ATB.	33
2.3.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane.	33
2.3.2. Antibiotique inhibant la synthèse protéique.	37
2.3.3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques.	39
2.3.4. Antibiothiques agissant sur les membranes.	41
2.4. Utilisation des antimicrobiens en production aviaire.	41

3.	ANTIBIORESISTANCE.	44
3.1.	Définition de la résistance aux ATB.	44
3.2.	Transfert horizontal de la résistance.	45
3.3.	Les vecteurs des gènes de résistance.	47
3.4.	Mécanismes de résistances.	49
3.4.1.	Inactivation enzymatique de l'antibiotique.	49
3.4.2.	Modification de la cible.	53
3.4.3.	Diminution de la perméabilité.	54
3.4.4.	Excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux.	55
3.5.	Mécanismes de résistance d'E. Coli aux antibiotiques.	55
4.	PARTIE EXPERIMENTALE.	
4.1.	Objectif de l'étude.	58
4.2.	Région et période de l'étude.	58
4.2.1.	Présentation de la wilaya d'Ain Defla.	58
4.3.	Matériel et méthodes.	59
4.3.1.	Prélèvements.	59
4.3.1.1.	Autopsie.	59
4.3.1.2.	Confection des prélèvements.	59
4.3.1.3.	Conservation des prélèvements.	60
4.3.2.	Bactériologie.	60
4.3.2.1	Matériel.	60
4.3.2.2.	Décongélation des prélèvements	61
4.3.2.3.	Découpe des organes.	61
4.3.2.4.	Pré-enrichissement.	61
4.3.2.5.	Ensemencement.	61
4.3.2.6.	Identification des germes.	62
4.3.2.6.1.	La galerie API 20E.	62
4.3.3.	Sérotypage.	63
4.3.4.	Antibiogramme.	65
4.3.5.	Recherche des $\beta$ lactamases à spectre élargi.	68
4.4.	RESULTATS	71
4.4.1.	Distribution des prélèvements en fonction de l'âge	71
4.4.2.	Fréquence des différentes lésions retrouvées	72
4.4.3.	Examen bactériologique	73

4.4.4. Résultats du sérotypage	74
4.4.5. Résultats des antibiogrammes	75
4.4.6. Les BLSE	80
4.5. DISCUSSION	82
CONCLUSION	92
RECOMMANDATIONS	93
APPENDICES	95
Appendice A : productions avicoles en Algérie	95
Appendice B : matériel de laboratoire	96
Appendice C : sérums co-agglutinés	99
Appendice D : tables de lecture	100
Appendice E : liste des abréviations	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

### LISTE DES FIGURES

Figure 2.1.	Arrêt de l'innovation antibiotique entre 1962 et 2000	33
Figure 3.1.	Schéma représentant les mécanismes du transfert Horizontal des résistances	47
Figure 4.1.	Carte géographique de la wilaya d'Ain Defla	58
Photo 4.2.	Prélèvement des organes	60
Photo 4.3.	Conservation des prélèvements	60
Photo 4.4.	Réalisation du sérotypage	64
Photo 4.5.	Exemple d'antibiogramme sur gélose Mueller Hinton	67
Photo 4.6.	Disposition des disques d'AMC et CTX	68
Schéma 4.7.	Les différentes étapes de l'examen bactériologique, sérotypage et antibiogramme	70
Figure 4.8.	Distribution des prélèvements en fonction de l'âge	71
Photo 4.9.	Aspect général d'une colibacillose	72
Photo 4.10.	Omphalite chez un poussin	72
Photo 4.11.	Aspect d'une péritonite	72
Photo 4.12.	Aerosacculite fibrineuse	73
Photo 4.13.	Colonies d' <i>E.coli</i> sur gélose Hecktoen	73
Photo 4.14.	Observation au microscope optique d' <i>E.coli</i>	74
Photo 4.15.	Profil biochimique sur galerie Api 20 <sup>E</sup>	74
Figure 4.16.	Représentation de la proportion des sérotypes	75
Figure 4.17.	Sensibilité globale des souches vis-à-vis des antibiotiques testés	76
Figure 4.18.	Fréquence des multirésistances d' <i>E.coli</i>	78
Figure 4.19.	Représentation de la proportion des antibiotypes retrouvés	79
Photo 4.20.	Profil de BLSE	80

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Tableau récapitulatif des antibiotiques utilisés en aviculture	42
Tableau 4.1. Nombre de prélèvements par tranche d'âge	71
Tableau 4.2. Fréquence des différentes lésions de colibacilloses rencontrées lors de l'examen nécropsique	72
Tableau 4.3. Répartition des sérotypes	74
Tableau 4.4. Résultats de l'antibiogramme	75
Tableau 4.5. Résultats des valeurs d'indépendance entre sérotypes et Résistance	77
Tableau 4.6. Fréquence des multirésistances <i>d'E.coli</i>	78
Tableau 4.7. Liste des antibiotypes les plus fréquents des <i>E.coli</i> isolés	79
Tableau 4.8. Résistance et sensibilités des 3 souches présentant une BLSE	81

## INTRODUCTION

Historiquement, dès les années 70, l'aviculture algérienne a bénéficié d'importants investissements qui lui ont permis d'évoluer très rapidement vers un système de production de type intensif et, de ce fait, assurer à la population un apport privilégié en protéines animales.

L'avènement des réformes économiques en 1988 et la libéralisation du marché des importations avicoles ont généré une crise structurelle qui s'est traduite par un recul de la production avicole, mettant à nu des dysfonctionnements au niveau des différents maillons de la filière. Ce repli de la production avicole est aggravé aujourd'hui par un contexte mondial caractérisé par la crise des matières premières sur le marché international. Cette conjoncture est peu propice à l'essor de la production avicole en Algérie [1][2].

Aujourd'hui, Le citoyen algérien consomme, en moyenne 10 kg de viande blanche par année. [1] (Appendice A), une évolution qui reste encore mineure pour assurer une autosuffisance en viandes blanches.

Aussi, cette évolution s'est faite sans maîtrise des règles d'hygiène entraînant le développement dans les élevages de diverses pathologies aux conséquences souvent désastreuses pour la volaille, voire pour l'Homme. C'est le cas de la colibacillose aviaire, une infection bactérienne, due à *Escherichia coli*, très fréquente en aviculture.

Les *Escherichia coli* aviaires, bien que considérés par beaucoup comme pathogènes secondaires, représentent à l'heure actuelle l'une des plus importantes causes de pertes économiques dans le secteur avicole. Elles conduisent de surcroît à de nombreux traitements antibiotiques avec les risques d'émergence de résistance qui les accompagnent. [3]

L'augmentation des résistances bactériennes à l'échelle mondiale représente une menace majeure pour la santé publique.

C'est donc en raison de l'impact à la fois hygiénique et économique de la colibacillose et du risque d'émergence des résistances aux traitements antibiotiques que nous avons entrepris cette étude dans les élevages de poulets de chair à Aïn Defla.

L'objectif général de cette étude est d'isoler, de sérotyper et de déterminer la fréquence des résistances des souches d'*Escherichia coli* isolées de poulets de chair envers les antibiotiques les plus utilisés en aviculture.

## CHAPITRE 1

### ***ESCHERICHIA COLI***

#### 1.1. Historique :

*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». [4]

C'est en 1919 que CASTELLANI et CHALMERS lui donnent son nom définitif en hommage à ESCHERICH. [5]

*Escherichia* est ensuite devenu le genre-type de la famille des Enterobacteriaceae et *E.coli* l'espèce type de ce genre. Depuis, elle devient l'espèce la plus étudiée par les biologistes pour des travaux de physiologie et de génétique.[4]

#### 1.2. Généralités sur les entérobacteriaceae :

La famille des entérobacteriaceae est une vaste famille constituée de genres bactériens rassemblés en raison de caractères bactériologiques communs :  
Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 µm de long et de 0.3 à 1µm de large, mobiles ou immobiles grâce à une ciliature péritriche, se développent en aéro-anaérobie et sur milieux ordinaires, acidifiant le glucose par voie fermentative avec ou sans production de gaz, ne possédant pas d'oxydase, et réduisant les nitrates en nitrites. [4]

#### 1.3. Habitat :

*Escherichia coli* est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud.

Dans l'intestin humain *E.coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies. [4]

#### 1.4. Caractères morphologiques :

*E.coli* sont des bacilles à Gram négatif avec des bords arrondies de 0.3 à 1µm de diamètre et de 1 à 6µm de longueur, on les retrouve isolés ou par paire. Ils sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, quelques fois immobiles. [6]

#### 1.5. Caractères culturaux :

*E.coli* se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. [4]

#### 1.6. Caractères biochimiques :

Les principaux caractères positifs sont : indole, ONPG et mannitol, par contre les caractères suivant sont positifs de façon moins constante : LDC, ODC, sorbitol, production de gaz.

Sont toujours négatifs : inositol, urée, TDA, VP, citrate de Simmons [7]

Elle possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase.

#### 1.7. Caractères antigéniques :

Antigènes O : ils sont de nature lipopolysaccharidique, thermostables, localisés au niveau de la paroi bactérienne. Au moyen d'immuns sérums spécifiques, il est possible de classer les souches d'*Escherichia coli* dans les groupes O, il existe plus de 180 antigènes O différents [4]

Antigènes K capsulaires : de nature polysaccharidique, thermolabiles. Ils inhibent l'agglutination de O lorsqu'ils sont présents, ils sont détruits par ébullition.

Chez l'animal, l'antigène K88 est présent chez les souches responsables de diarrhées du porcelet et K99 chez des souches de diarrhées du veau et de l'agneau. [4]

Antigènes H flagellaires : présents chez les formes mobiles, ils sont de nature protéique. Il existe plus de 56 antigènes H. [4] [7]

## 1.8. Pouvoir pathogène chez l'homme :

### 1.8.1. Infections intestinales :

#### 1.8.1.1. *Escherichia coli* Entero Toxinogènes (ECET) :

Elles sont responsables de diarrhées très liquides survenant dans les pays en voie de développement et chez les voyageurs « turista ». [8]

ETEC colonise la surface de l'intestin grêle et élabore des entérotoxines qui provoquent une augmentation de la sécrétion intestinale. La colonisation est assurée par différentes structures de la surface du corps bactérien d'origine fimbrielle ou afimbrielle grâce auxquels les bactéries s'amarrent aux entérocytes de l'intestin grêle. Ils sont désignés par CFA (colonization factor antigen), CS (coli surface antigen) ou PCF (putative colonization factor). Cela empêche leur élimination rapide par le péristaltisme.[9]

Sa pathogénicité repose d'autre part sur les deux entérotoxines, LT (thermolabile) et ST (thermostable). LT est une toxine très proche de la toxine cholérique, elle stimule l'activité de l'adényl cyclase (augmente la production d'AMPc), et ST stimule l'activité de la guanylate cyclase (GMPc). Du fait de l'augmentation des taux d'AMPc et de GMPc, s'installent une inhibition de l'absorption de Na<sup>+</sup> et une augmentation de la sécrétion de Cl<sup>-</sup> par les entérocytes, entraînant une importante fuite hydrique. Les entérotoxines et le CFA sont déterminés par des gènes de localisation plasmidique. [9][10]

### 1.8.1.2. *Escherichia coli* Entéro Pathogènes (ECEP) :

Ce sont les premiers pathotypes à être décrits. Découverts pour la première fois au Royaume-Uni en 1945. [8]. Ces souches sont responsables de gastro-entérites infantiles. Ils touchent en particulier les enfants en bas âge (< 3 ans), devenues rares dans les pays industrialisés mais restent la cause la plus fréquente de mortalité des nourrissons dans le tiers monde.[9]

Les EPEC se fixent aux cellules épithéliales de l'intestin grêle par des fimbriae et provoquent un effacement caractéristique des microvillosités de la cellule intestinale grâce à différents gènes chromosomiques regroupés dans un îlot de pathogénicité appelé LEE (locus d'effacement de l'entérocyte) [9][10].

Ce phénomène est appelé « attachement-effacement ». LEE code pour une autre protéine située sur la membrane externe de la bactérie nommée « intimine » qui permet le renforcement de l'adhésion grâce à son récepteur situé sur la membrane de l'entérocyte et la stimulation de la réponse immunitaire.

En effet, la bactérie excrète différentes protéines par un système de sécrétion de type 3. Ces protéines vont agir sur la cellule cible s'accompagnant de remaniement du cytosquelette. [10]

### 1.8.1.3. *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) :

Découverts pour la première fois en 1982 [8]. Ils sont la cause de la colite hémorragique et du syndrome hémolytique et urémique (SHU), qui survient dans environ 5% des infections à EHEC, avec insuffisance rénale aiguë, hémolyse intravasculaire avec apparition d'érythrocytes fragmentés et thrombopénie. Les EHEC produisent des cytotoxines, toxines similaires à la shigatoxine des shigelles d'où leur nom : shiga like toxine (SLT) ou vérotoxine (VT) en raison de leur action sur les cellules vero (cellule rénale du singe d'Afrique), elles sont au nombre de deux (SLT1 et SLT2). Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères formés d'une sous-unité A et de 5 sous-unités B. La sous-unité A a une activité N-glycosidase qui provoque une perturbation des synthèses protéiques de la cellule cible infectée. [11]

Le mécanisme d'attachement-effacement est aussi un des facteurs de virulence, il est codé par le l'ilot de pathogénicité LEE [12]

Après avoir traversé l'épithélium intestinal, les toxines seraient capables de diffuser par voie systémique vers le rein, causant des dommages aux cellules endothéliales vasculaires humaines, au niveau du côlon, au niveau du parenchyme rénal et au niveau du système nerveux central expliquant les manifestations cliniques observées. [8]

Une action directe de SLT au niveau des microvillosités des cellules épithéliales intestinales a été suggérée, pouvant être responsables de l'inhibition de la réabsorption d'eau au niveau du côlon. [8]

L'inflammation rénale serait la résultante de la toxicité directe de SLT, d'une part et d'autre part par l'induction de la production de cytokines inflammatoires, causant une occlusion de la microvascularisation rénale.

La contamination humaine se fait principalement par la nourriture d'origine animale et surtout par la viande de bœuf hachée insuffisamment cuite. Le sérovar le plus fréquent dans le SHU est O157H7 dont le principal réservoir est le tractus intestinal bovin. [9]

#### 1.8.1.4. *Escherichia coli* entéro-invasifs (ECEI) :

Ce sont des souches très proches de *Shigella dysenteriae*. Elles ont la capacité d'envahir les cellules du côlon grâce à des gènes plasmidiques et provoquent des inflammations abcédées. Elles sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse. La présence de leucocytes dans les selles témoigne du processus invasif [4] [8]

#### 1.8.1.5. *Escherichia coli* entéroagrégatifs (EAEC) :

Ce sont des souches qui adhèrent aux cellules en formant des agrégats, grâce à des fimbriae, dont les gènes sont plasmidiques. Elles augmentent la sécrétion de mucus par les entérocytes. Elles provoquent des diarrhées prolongées et sont rencontrés surtout dans les pays en voie de développement. [10]

#### 1.8.1.6. *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC) :

Le rôle de DAEC dans les infections intestinales est controversé [9]

Elles seraient responsables de diarrhées et d'infections urinaires. Les diarrhées peuvent être aqueuses et contenir du mucus.

L'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse », sur les lignées cellulaires en culture de type Hep-2. [8][13].

#### 1.8.2. Les infections extra intestinales (ExPEC):

Certains facteurs de virulence caractérisent les ExPEC, incluant les adhésines fimbriales (F1, P), les systèmes de séquestration du fer (aérobactine), les hémolysines, la capsule, et bien d'autres [14]. Les ExPEC semblent ne pas connaître la barrière d'espèces, et les souches humaines sont génétiquement proches des souches aviaires [15]. Les APEC et les UPEC sont les deux grands groupes au sein des ExPEC, et ont parmi eux un nombre important de souches non sérotypables [14]

##### 1.8.2.1. Infections urinaires :

*Escherichia coli* est la bactérie le plus souvent en cause dans les infections urinaires communautaires qu'elles soient basses (cystites) ou hautes (pyélonéphrite). Les souches provenant de la flore fécale contaminent les voies urinaires par voie ascendante. Des anomalies obstructives, une vessie neurologique et un reflux vésico-urétral favorisent leur apparition ; la grossesse augmente le risque de pyélonéphrite. [9] [10]

Ces souches possèdent des facteurs de virulence particuliers. La présence de fimbriae (de type P et de type 1), de certains antigènes O, de polysaccharides capsulaires (antigènes K), la production d'hémolysine, d'aérobactine, et la résistance au pouvoir bactéricide du sérum (par le complément) sont les facteurs principaux. [4]

#### 1.8.2.2. Méningites néonatales :

Un tiers d'entre elles sont dues à *E.coli*. Les souches en cause possèdent le plus souvent un antigène polysaccharidique de type K1. [4]

#### 1.8.2.3. Infections diverses :

Les *E.coli* peuvent être en cause de péritonites, de cholécystites, de salpingites et de suppurations postopératoires jouant le rôle de bactéries pyogènes.

Toutes ces infections, si elles sont insuffisamment traitées, peuvent être à l'origine de septicémies. [4]

#### 1.9. Pouvoir pathogène chez l'espèce aviaire :

Il s'agit des colibacilloses qui sont sans doute les infections bactériennes les plus fréquentes et les plus importantes en pathologie aviaire, conduisant à de nombreux traitements antibiotiques avec les risques d'émergence de résistances. Elles peuvent entraîner la mortalité, baisses de performances et saisies à l'abattoir. Contrairement aux infections des mammifères, les colibacilloses aviaires prennent des formes générales, avec une voie d'entrée respiratoire ou génitale.

La plupart des colibacilloses sont des surinfections, à la suite d'infections virales ou bactériennes (mycoplasmes respiratoires notamment). [16][17]

#### 3.9.1. Pathogénie :

La voie d'entrée principale de l'agent pathogène est le tractus respiratoire, via l'inhalation de particules de poussière contaminées par des *E.coli* excrétées du tractus digestif d'animaux sains. Les intestins sont, en effet, le réservoir le plus important des *E.coli* pathogènes aviaires ou APEC. Après une première multiplication au niveau du tractus respiratoire supérieur, les bactéries colonisent les voies respiratoires profondes à savoir les sacs aériens et les poumons. Sachant que leur protection dépend des polynucléaires hétérophiles

Dans une troisième étape, la bactérie atteint le sang et colonise les organes internes comme le cœur, le foie et la rate. [3] [16]

Plus de 1000 sérotypes sont connus mais peu d'entre eux sont ceux qui jouent un rôle important en pathologie aviaire, les plus précocement identifiés sont O1, O2, O35 et O78 par Sojka et Carnaghan (1961). Les dernières études réalisées montrent que les plus présents et les plus pathogènes sont les sérotypes O1, O2 et O78, représentant de 15 à 61% des souches isolées bien que d'autres soient aussi présents [18]. Les autres sérotypes représentés de manière significative sont: O8, O15, O18, O35, O88, O109, O115 et O116. Ces résultats ont été confirmés sur une grande collection de souches aviaires isolées d'animaux morts de colibacillose dans le cadre du projet Européen Fair 6-CT98-4093, par le biais d'une enquête épidémiologique et par un test de létalité sur poussins d'un jour. [3]

#### 1.9.2. Les manifestations cliniques de la maladie :

Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, *Escherichia coli*, chez la volaille n'est qu'assez peu impliquée en pathologie digestive mais participe à des syndromes variés évoluant sous forme septicémique ou localisée, maladie respiratoire chronique, omphalite, synovite, coligranulomatose, salpingite. [19]

##### 1.9.2.1. Maladie respiratoire chronique et colisepticémie :

La contamination se fait par voie respiratoire et est secondaire à une infection à mycoplasmes (*Mycoplasma gallisepticum*), à une virose à tropisme respiratoire (bronchite infectieuse) ou immunosuppressive (maladie de Gumboro), à un accident de vaccination ou à une concentration trop élevée en agents irritants dans l'air (poussière ou ammoniac).[16]

La maladie s'observe à tout âge avec une fréquence supérieure entre 2 et 10 semaines, Le premier signe clinique rencontré est une chute importante de la consommation alimentaire. Ensuite, de l'abattement accompagné d'hyperthermie (42 à 44°C) et des symptômes respiratoires non spécifiques (toux, râles, éternuement, jetage, larmoiement) se manifestent. [17]

Les animaux les plus atteints présentent alors des signes de détresse respiratoire (bec ouvert, respiration accélérée et irrégulière).

Au niveau lésionnel, les organes les plus touchés sont les sacs aériens (aérosacculite), le foie (périhépatite), le cœur (péricardite) et par contiguïté de tissu, la cavité abdominale (péritonite).[8]

Au niveau du cœur, le péricarde prend un aspect opaque et oedémateux et se remplit d'un exsudat fibrineux. Les sacs aériens quant à eux perdent leur transparence, s'épaississent et présentent un aspect congestif. Quant aux autres organes, tels que le foie et la rate, les lésions sont surtout localisées en périphérie de ceux-ci, et sont caractérisées par de la congestion, un épaissement du tissu et un dépôt de fibrine. Ce dépôt est parfois tellement important que la surface de l'organe prend l'aspect d'une crêpe. [16] [17]

Les premiers signes microscopiques consistent en l'apparition d'un œdème suivi d'une infiltration d'hétérophiles. Ensuite, dans un second temps apparaissent les phagocytes qui deviennent rapidement majoritaires. Les lésions sont alors caractérisées par la présence de ceux-ci, de cellules géantes et de débris nécrotiques caséux. [3]

La colisepticémie est la forme septicémique de la colibacillose, elle se traduit par des mortalités, après abattement, anorexie, due souvent à une complication de la colibacillose respiratoire, omphalite ou synovite. Les lésions sont non exsudatives, avec foie et rate hypertrophiés, avec des points de nécrose et une légère ascite.

#### 1.9.2.2. Mortalités embryonnaires et du jeune poussin :

Cette expression de la colibacillose constitue probablement avec les erreurs d'élevage, la cause la plus importante de mortalité chez les poussins âgés de moins d'une semaine. La contamination de l'œuf et plus précisément de la membrane vitelline, se fait essentiellement lors de la ponte, au passage de celui-ci par le cloaque. Les bactéries alors présentes dans les matières fécales de la poule viennent se déposer à la surface de l'œuf. Ensuite, celles-ci pénètrent à travers les membranes coquillières et vont contaminer la membrane vitelline. [18]

La possibilité de contamination des œufs à partir de lésions de salpingite ou d'ovarite existe mais reste peu fréquente (0,5 à 6% des œufs sont contaminés par

*E.coli*). Les mortalités embryonnaires sont constatées un peu avant l'éclosion, les œufs contaminés présentent une coquille de moindre qualité; sont plus chauds et leur surface est mouillée. Les mortalités se poursuivent encore après l'éclosion et ce, pendant une période de 3 semaines. Les retards d'involution de la vésicule vitelline sont fréquents chez les poussins contaminés et peuvent parfois s'accompagner d'omphalite; la mortalité peut être importante et les lésions correspondent à l'altération du sac vitellin dont le contenu va du jaune brun au vert et de la consistance aqueuse à granuleuse. Ceux qui passent le cap des 3 semaines présentent bien souvent des lésions de péricardite ou d'aérosacculite. Parfois cependant, la seule manifestation de la maladie est la réduction du gain quotidien moyen [3][19]

#### 1.9.2.3. Ovarites et salpingites :

Accompagnent ou non les manifestations respiratoires ; elle apparaît lorsque le sac aérien abdominal gauche est atteint par les *E.coli*. Les bactéries se propagent alors, par contiguïté de tissu, pour atteindre l'oviducte et y persister quelques temps se traduisant par des chutes de ponte survenant en particulier au 2-3ème mois de ponte, des morts subites et des diarrhées blanches. L'autopsie révèle des lésions souvent spectaculaires d'ovarosalpingite et de péritonites. [19]

D'un point de vue histologique, les lésions consistent en une diminution de l'épaisseur des parois de l'oviducte, la présence d'hétérophiles, de fibrine et de débris nécrotiques caséifiés. [3]

#### 1.9.2.4. La coligranulomatose (maladie de Hjarre)

Elle est peu fréquente, mais peut cependant entraîner un taux de mortalité élevé dans certains lots ; elle est caractérisée par la formation de multitude de petites formations nodulaires (granulomes) sur le foie, l'intestin grêle, les caeca et le mésentère sans atteinte de la rate, ce qui facilite le diagnostic différentiel avec la tuberculose. [17][20]

#### 1.9.2.5..Swollen head disease : syndrome de la tête enflée :

Cette maladie est caractérisée par une inflammation aiguë à subaiguë des cellules de la peau et du tissu sous- cutané de la tête et des régions périorbitaires. La colonisation des tissus par les colibacilles est secondaire à une infection par des agents prédisposant comme les virus (pneumovirus, paramyxovirus, coronavirus) ou des teneurs élevées en ammoniac. La morbidité et la mortalité sont souvent faibles (1%). Les conséquences les plus importantes sont des retards de croissance et des pertes économiques conséquentes. [3] [18]

Les lésions microscopiques consistent en l'apparition d'un œdème de la tête et de la région périorbitaire, d'un exsudat caséux dans le tissu conjonctif de ces régions ainsi qu'au niveau des glandes lacrymales. [3]

#### 1.9.2.6. Dermatite nécrotique :

Cette expression consiste en l'apparition de plaques de fibrine sous la peau située dans la partie inférieure de l'abdomen. Elle est responsable de pertes économiques substantielles notamment à l'abattoir. [3]

#### 1.9.2.7. Arthrites et synovites :

Les colibacilles peuvent surinfecter des maladies primitives (arthrites à réovirus, synovite à *Mycoplasma synoviae*) ou être inoculés par des blessures ou traumatismes. Après avoir été affectés par la colisepticémie, les oiseaux semblent ne pas pouvoir éliminer complètement la bactérie, développant ainsi des arthrites et des synovites. [16] [18]

#### 1.9.3. Facteurs de virulence :

Un certain nombre de facteurs de virulence ont été étudiés chez les APEC. Ces facteurs de virulence regroupent les adhésines (fimbriaires ou afimbriaires) impliquées dans l'adhérence des bactéries au tractus respiratoire, la résistance à l'activité bactéricide du complément ou résistance au sérum, nécessaire à la

survie des bactéries dans le sang, les systèmes de captation du fer (aérobactine), utiles à la multiplication des bactéries dans le sang; les toxines [16] [17]

#### 1.9.3.1. Les adhésines :

Les adhésines ont été proposées comme facteurs de virulence bactérienne chez les APEC pour la première fois par Arp and Jensen en 1980, qui observèrent dans la trachée des dindons une persistance plus importante des souches virulentes d'*E.coli* pourvues de fimbriae comparativement à des souches non virulentes et dépourvues de fimbriae.[19] [21]

En effet, les adhésines procurent à la bactérie la capacité d'adhérer aux tissus épithéliaux de l'hôte, cette phase d'adhésion étant une étape importante pour la pathogenèse de l'infection à *E.coli*. L'adhésion permet à la bactérie de résister au système de défense, favorise la multiplication bactérienne et la formation de microcolonies. Les fimbriae de type 1, les fimbriae P et les curli sont les adhésines les mieux décrites dans la littérature concernant les APEC, mais de nouvelles adhésines impliquées dans la virulence des APEC sont régulièrement découvertes. [22]

##### 1.9.3.1.1. Fimbriae de type 1 :

Ce sont les structures somatiques que l'on trouve chez *E.coli* et plusieurs autres entérobactéries. Ils sont impliqués dans l'initiation de la colonisation de l'épithélium des voies respiratoires [22]. Cependant, d'autres facteurs comme la mobilité et la production de colicine V seraient également nécessaires à une persistance de la colonisation. Les fimbriae de type 1 sont capables de se fixer sur les récepteurs riches en mannosides des cellules épithéliales de la trachée. [23]

Les fimbriae de type 1 sont constitués d'une protéine majeure FimA, associée à d'autres protéines ancillaires (FimF et FimG) et d'une adhésine FimH. Celles-ci sont codées par un ensemble comprenant 9 gènes dont 7 sont présents sur un même opéron. [18]

Les fimbriae de type 1 furent longtemps considérées comme des facteurs de virulence importants. Les études de prévalence sur des APEC associés à des

pathologies spécifiques montrent que la prévalence du gène fim peut atteindre 100% dans les cas de colisepticémie [24].

Wooley, a trouvé que l'ensemble des 40 souches *d'E.coli* isolées lors de colisepticémie portait une fimbria de type 1 alors que seulement 23 souches intestinales sur 40 possédaient cette propriété [22]

Cependant, depuis ces résultats, d'autres études donnent des résultats qui diffèrent. En effet, des expériences menées sur un mutant dont la totalité de l'opéron fim est délétée montre que l'expression des fimbriae n'est pas nécessaire à la colonisation de la trachée et des sacs aériens [25]. Une autre étude portant sur un mutant fimH a donné les mêmes conclusions. Paradoxalement, leur perte semble d'ailleurs un élément favorable à la colonisation trachéale par les APEC. [26]. De plus, un essai de vaccination à partir du domaine fimH sur des poulets n'a révélé aucune protection contre les APEC. [27]

#### 1.9.3.1.1. Fimbriae de type P :

Les adhésines fimbriaires de la famille P ont d'abord été décrites chez les *E. coli* appartenant aux UPEC, puis chez les APEC [23] [28] [29]. Le fimbriae P est codé par différents opérons comme les opérons pap et prs. Le gène papC est très important dans la détection du fimbriae P parce qu'il représente une séquence commune à tous les fimbriae de cette famille et est utilisé dans la PCR pour détecter le fimbriae. [30]

La présence de l'opéron prs est significativement plus fréquente chez les souches isolées de poulets atteints de colisepticémie que chez les souches isolées de poulets sains. [9]

Sur le plan de la pathogénicité, le rôle des fimbriae P n'est pas encore complètement élucidé. Elle ne semble pas jouer de rôle majeur dans l'adhésion aux cellules du pharynx et de la trachée, suggérant que le récepteur de cette adhésine n'y est pas présent. En d'autres termes, cette adhésine pourrait jouer un rôle plus tardif dans le processus de l'infection. [29]

A l'heure actuelle, les études sur une grande collection de souches isolées de volailles présentant des lésions de colibacillose montrent que, le fimbriae de type P est retrouvé chez 20 à 25% de ces souches. [18]

#### 1.9.3.1.3. Les curli :

Les curli sont des minces fibres agrégatives de surface que l'on trouve chez les *E. coli* aussi bien pathogènes que non-pathogènes. Les curli possèdent plusieurs propriétés telles que la capacité de fixer la fibronectine, la lamine, et d'autres protéines du sérum ainsi que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) et le rouge Congo. [31]

Selon Persson et al, en 2003, les curli pourraient avoir un rôle d'activation de la coagulation en cascade du fibrinogène et d'induction des cytokines pro inflammatoires. Dans la plupart des études, la présence des curli est plus souvent associée aux *E. coli* pathogènes qu'aux *E. coli* saprophytes. [31][32]

Récemment, les résultats de Mellata et al. démontrèrent que le gène *csg* (curli subunit gene) est présent chez les *E.coli* virulents mais aussi chez la souche non virulente. [33]

#### 1.9.3.1.4. Autres adhésines :

La présence d'autres adhésines a été démontrée parmi les souches APEC, telles que les fimbriae AC/1, F17, Afa, Sfa, Eae. [23]

Des études menées par Gérardin et collaborateurs en 2000 et Mellata et collaborateurs en 2001 sur quelques souches d'*E.coli* aviaires irlandaises et algériennes et une étude récente menée par Stordeur et collaborateurs en 2002 sur une collection de 1600 souches APEC, ont montré que des facteurs de virulence tels que les adhésines F17, Afa-8 et S ainsi que des séquences relatives au gène *eae*, décrits chez d'autres espèces comme le bovin, le mouton ou l'homme pouvaient aussi être rencontrés chez les souches APEC. [33] [34]

#### 1.9.3.2. Résistance au sérum :

La résistance à l'effet bactéricide du complément dans le sérum, médiée par différentes structures bactériennes comme la capsule, le lipopolysaccharide, des protéines de membrane externe, est associée aux souches APEC, surtout celles isolées de lésions de septicémie. [3]

Ainsi, il a été démontré, par Mellata et Dho-Moulin, qu'une corrélation existe entre la résistance au sérum et la virulence des souches. [35].

#### 1.9.3.2.1. La capsule :

Plus de 80 capsules polysaccharidiques (antigène K) chimiquement distinctes ont été décrites chez les *E.coli*. Cependant, très peu d'entre-elles sont associées aux infections invasives. Les capsules confèrent à la bactérie de la résistance à l'immunité spécifique et non spécifique de l'hôte. En absence d'anticorps spécifiques, la capsule joue un rôle de protection de la bactérie contre l'effet bactéricide du sérum et contre la phagocytose facilitant ainsi la colonisation des organes internes chez les volailles [35][36]. La capsule K1 est fréquemment associée aux APEC de sérotype O1, O2 et non typables. La capsule K80 est associée au sérotype O78. [37].

#### 1.9.3.2.2. Les protéines de la membrane externe OMPS (Iss et traT) :

Les gènes iss («increased serum survival») et traT codent respectivement pour les protéines de la membrane externe Iss et traT et leur rôle dans la virulence des souches APEC n'est pas complètement élucidé, mais des études ont montré qu'ils augmentent la résistance au sérum. [38]

En effet, il a été démontré que la présence de iss augmenterait 100 fois la virulence des souches chez le poussin d'un jour et de 20 fois la résistance au complément. Le gène traT avait été associé à la résistance au sérum chez les Enterobacteriaceae. Le rôle du gène traT dans la virulence des *E.coli* a été rarement abordé dans les récentes études, et son rôle spécifique dans la virulence des souches d'*E.coli* semble limité et probablement attribuable à d'autres gènes de virulence portés sur le même plasmide de virulence. [38]

Mellata et al, en 2003 ont montré que les souches iss et traT positifs qui ont perdu les antigènes K1 et O n'étaient plus protégées contre l'effet bactéricide du sérum, suggérant un rôle limité du gène iss et traT dans la protection contre le sérum. [35]

### 1.9.3.3. Les systèmes de captation du fer :

L'aptitude des bactéries pathogènes à séquestrer le fer depuis les liquides organiques est primordiale pour l'expression de la virulence. [38]

Le système de transport du fer est considéré comme faisant partie du système de défense inné de l'hôte. Naturellement l'hôte limite la disponibilité du fer nécessaire à la croissance bactérienne, via des liaisons fer-protéine [33]. Pour palier la faible disponibilité de fer chez l'hôte, les bactéries pathogènes ont élaboré des systèmes de captation du fer ou «iron-regulated OMPs» (IROMPs). Le plus étudié étant le « système aerobactine »

Les aérobactines, ont une très grande affinité pour le fer. Cette affinité aboutit à la formation d'un complexe fer-aérobactine. En même temps, les bactéries s'équipent à leur surface de protéines transporteuses (IutA) permettant l'entrée en leur sein de ce complexe. [39]

Ce système, dont l'opéron est situé sur un grand plasmide (80 Kb), fonctionne in vivo et son rôle principal serait de permettre aux bactéries de pouvoir se multiplier dans le sang ou les organes autres que l'intestin [40]. D'autre part, la corrélation élevée entre la production de l'aérobactine et la virulence des souches APEC, a permis le développement d'un test de diagnostic basé sur la détection par réaction immunologique de la protéine IutA, qui est le récepteur membranaire pour le complexe aérobactine-fer. [18]

Il a été démontré que la production de l'aérobactine est plus fréquente chez les APEC que chez les souches non-pathogènes d'*Escherichia coli*. [29]

Il existe aussi d'autres systèmes de captation du fer qui jouent un rôle important dans la virulence des APEC, ils sont souvent plasmidiques et parfois chromosomiques. Ils coexistent fréquemment chez la même bactérie. [33]

### 1.9.3.4. Toxines :

Quelques études ont démontré que les souches APEC sont capables de produire des toxines pouvant être impliquées dans le processus pathogénique. Cependant, hormis la toxine VT2y (semblable à la toxine VT2v associée à la maladie de l'œdème du porcelet) présente chez 72% des souches associées à la

“Swollen head disease” et “*Escherichia coli* vacuolating factor” ou ECVF, toxine ressemblant à la toxine VacA d'*Helicobacter pylori*, décrit chez une trentaine de souches aviaires pathogènes, aucune ou très peu de souches APEC sont positives pour les toxines LT, VT, CNF, CDT ou autres. [3]

#### 1.9.3.5. Hémagglutination :

L'hémagglutinine sensible à la température ou Tsh (temperature sensitive hemagglutinin) est l'un des facteurs de virulence les mieux étudiés chez les APEC, il a été rapporté pour la première fois en 1994, puis il a été proposé comme marqueur moléculaire pour détecter les APEC. C'est une protéine de surface thermosensible, qui possède la capacité d'agglutiner les érythrocytes à température basse (26°C-30°C) et son activité est réprimée à 42°C.

Ce facteur est encodé par le gène du même nom, c'est-à-dire le gène tsh ; localisé sur un plasmide et il a été isolé à partir des souches APEC les plus virulentes isolées de poulets avec des signes respiratoires. [41]

Dans une étude réalisée par Dho-Moulin et al sur 300 souches d'*Escherichia coli* originaires de France et du Québec, il a été montré la présence du tsh chez les souches pathogènes était bien plus élevé que chez les souches non pathogènes,[18] ceci montre que cette protéine joue un rôle important dans la pathogénicité, elle est bi fonctionnelle, avec d'une part une activité adhésive et d'autre part une activité protéolytique. néanmoins son rôle précis n'est pas encore bien élucidé, il semble qu'elle pourrait stimuler la réaction inflammatoire et le développement des lésions avec dépôt de fibrine dans les sacs aériens. [32][42]

Il semble donc que chez les oiseaux (comme chez les mammifères) le pouvoir pathogène d'*Escherichia coli* est à déterminisme plurifactoriel.

### 1.10. Diagnostic

#### 1.10.1. Diagnostic clinique et nécropsique :

Le diagnostic de la colibacillose aviaire repose d'abord sur le tableau clinique et la présence de lésions telles que de l'aérosacculite, parfois accompagnée de

périhépatite et de péricardite. Il faut cependant garder à l'esprit que ces lésions peuvent aussi être engendrées par d'autres agents pathogènes comme *Mycoplasma* ou *Chlamydochila* dans les aérosacculite, *Salmonella* et *Pasteurella* pour la périhépatite ou la septicémie, maladie de Marek ou *Mycoplasma avium* pour les granulomes [3] [43]

#### 1.10.2. Diagnostic de laboratoire :

En présence de lésions évoquant la colibacillose, un isolement et une identification de l'agent responsable permettront de confirmer la maladie.

L'isolement d'une souche d'*E.coli* à partir d'une lésion pose toujours le problème de son identification comme pathogène ou non pathogène.

*E.coli* étant un hôte habituel du tube digestif des volailles, l'isolement d'une souche non pathogène ne peut pas être totalement exclu.

Il est donc nécessaire de compléter la caractérisation des souches potentiellement pathogènes par le sérotypage et le criblage des gènes codant pour les facteurs de virulence.

##### 1.10.2.1. Caractérisation des souches pathogènes :

Le sérotypage est la méthode la plus utilisée dans les laboratoires de diagnostic. Elle permet de caractériser les souches sur la base des antigènes de surface qu'elles possèdent. Les antigènes somatiques des groupes O1, O2 et O78 sont présents sur les souches de prélèvements pathologiques dans 15 à 60% des cas. Les problèmes proviennent de la difficulté à sérotyper les 40% restantes qui sont souvent assez pathogènes. Des tests sur animaux par exemple, le test de létalité sur poussin d'un jour permettent de confirmer que certaines de ces souches sont effectivement pathogènes, mais ce type de test, s'il apporte des précisions appréciables, reste trop lourd à mettre en œuvre pour un diagnostic de routine. [18]

### 1.11. Traitement :

A l'heure actuelle, celui-ci repose encore essentiellement sur l'antibiothérapie.

Les antibiotiques les plus utilisés sont les  $\beta$ -lactamines, les quinolones et les tétracyclines.

De récentes études, de par le monde, ont montré que le nombre de souches résistantes à ces divers antibiotiques allait en s'accroissant. Il est donc plus que jamais nécessaire de réaliser un antibiogramme avant ou en parallèle au traitement empirique. Des traitements alternatifs aux antibiotiques existent aussi, comme l'acide ascorbique qui contribue à intensifier l'activité des phagocytes [3]

### 1.12. Prévention :

Elle vise à contrôler les contaminations environnementales (l'humidité, la ventilation, la teneur en poussière et en ammoniac), les vecteurs animés ou inanimés, afin de réduire au maximum les facteurs prédisposants aux infections respiratoires. La qualité de l'eau de boisson est aussi très importante, il faut dès lors veiller à la changer très régulièrement.[3] [18]

Une autre mesure aussi importante, est la fumigation des œufs après la ponte et l'élimination des œufs souillés par les matières fécales, il est aussi recommandé de désinfecter les couvoirs et éclosiers, pour minimiser ainsi les risques de mortalités embryonnaires [43]

A l'heure actuelle, aucun vaccin efficace n'est disponible sur le marché vétérinaire. Cependant, même si un certain nombre d'essais vaccinaux ont été effectués à l'aide de souches atténuées en modèles expérimentaux et couronnés de succès avec des souches homologues, ils n'en restent pas moins inefficaces envers des infections avec des souches hétérologues de terrain. [3]

Des études ont été réalisées, notamment au Canada, et les essais in vivo démontrent que la réponse immunitaire est aussi forte contre les trois souches vaccinales (O1, O2, O78) qu'elles soient administrées ensemble ou séparément. Cette réponse immunitaire est détectable à 14 jours et continue d'augmenter 21 jours après la vaccination. [44]

## CHAPITRE 2

### LES ANTIBIOTIQUES

#### 2.1. Définition :

Un antibiotique est une substance, naturelle d'origine biologique, c'est à dire produit par des micro-organismes procaryotes (bactéries) ou eucaryotes (champignons microscopiques) ou d'origine chimique (synthétique ou semi-synthétique) et ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne
- Activité en milieu organique
- Bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme

Les antibiotiques perturbent les étapes essentielles du métabolisme des bactéries (synthèses protéiques, synthèse des acides nucléiques, réplication, transcription, transport transmembranaire, etc....) [45]

#### 2.2. Historique :

L'usage des antibiotiques a augmenté l'espérance de vie moyenne d'une quinzaine d'années. La découverte des antibiotiques constitue donc un événement majeur dans l'histoire de la médecine.

Dès 1877, Pasteur et Joubert mettent en évidence la notion d'antagonisme microbien (antibiose). Le terme d'antibiose (anti = contre, biose = vie) crée par Vuillemin en 1889 rend compte de ce phénomène et l'idée d'utiliser ces substances en médecine pour lutter contre les maladies bactériennes.

En 1928, Fleming observe l'inhibition de culture d'un staphylocoque par un champignon ayant accidentellement contaminé le milieu sur lequel il s'est développé. Il émet l'hypothèse que le champignon (qui est un pénicillium) élabore une substance bactéricide qu'il nomme pénicilline. Cependant il a fallu attendre, les travaux de Florey et Chain en 1941 pour que la pénicilline soit purifiée et employée en thérapeutique.

En 1932, Domagk avait découvert les propriétés bactéricides d'un sulfamide utilisé dans l'industrie des teintures.

En 1950, Waksman découvrait la streptomycine, premier antibiotique de la famille des aminosides qui avait un spectre d'activité très large incluant le bacille tuberculeux.

A partir de cette date, de nombreux antibiotiques sont découverts.

Le chloramphénicol est le premier antibiotique entièrement synthétique, tétracycline en 1949, aminosides en 1950, macrolides en 1952, glycopeptides en 1958, triméthoprime en 1970 et oxazolidinones en 2000.

Jusqu'à présent, la mise sur le marché d'un nouvel antibiotique a toujours été suivie de l'émergence de souches résistantes. [46] [47].

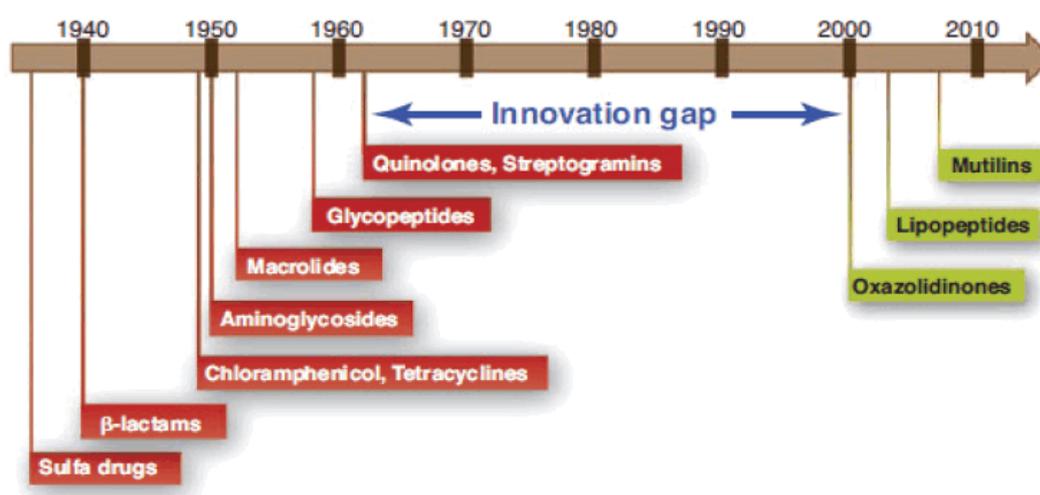


Figure 2.1 : arrêt de l'innovation antibiotique entre 1962 et 2000

### 2.3. Classification des antibiotiques selon leur mécanisme d'action :

On connaît actuellement environ 10 000 molécules ayant une activité antibiotique, mais une centaine d'entre-elles seulement est utilisée en médecine.

#### 2.3.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane :

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes polysaccharidiques reliées par des peptides. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il

existe des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces 2 phénomènes est rompu par cette classe d'antibiotique.

#### 2.3.1.1. Les $\beta$ -lactamines :

Il s'agit de la famille la plus vaste et la plus complexe.

Les  $\beta$ -lactamines ont en commun un noyau  $\beta$ -lactame, et ont un mécanisme d'action identique : ils inhibent la synthèse du peptidoglycane de la paroi, de ce fait, ils ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. [47]

Ce sont des analogues structuraux de la séquence D-Ala D-Ala du précurseur du peptidoglycane. Elles se fixent de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Ces protéines sont des enzymes impliquées dans la phase terminale de la synthèse du peptidoglycane (polymérisation). L'activité enzymatique des PLP est inhibée par leur liaison avec les  $\beta$ -lactamines. Ces enzymes sont situées sur la face externe de la membrane interne. [46]

Il existe plusieurs types de PLP dans une espèce bactérienne. (7 chez *E.coli* et 4 chez *S.aureus*). On aboutit alors à des cellules à paroi anormale qui, souvent ont des morphologies atypiques. [47]

On distingue deux groupes principaux : les pénicillines et les céphalosporines.

##### 2.3.1.1.1. Les pénicillines :

Elles possèdent un cycle thiazolidone accolé au noyau bêta lactame. Elles diffèrent par la nature de leur chaîne latérale. [10]

##### 2.3.1.1.1.1. Pénicillines G ou benzyl pénicilline :

C'est la première pénicilline découverte par Fleming, elle est produite par *penicillium notatum* et elle est active sur les bactéries Gram positif, à l'exception des staphylocoques dont la grande majorité produit une pénicillinase. [10]

La pénicilline G est la forme parentérale de la pénicilline. Elle n'est pas utilisée dans la filière avicole

#### 2.3.1.1.1.2. Pénicillines M :

Ces pénicillines sont la méticilline, l'oxacilline et la cloxacilline (La méticilline fut la première découverte). Elles ne sont pas utilisées dans la filière avicole. [46]

Elles ont toutes le même spectre d'action, soit celui des pénicillines conventionnelles sur les bactéries protégées par des pénicillinases, comme la majorité des souches de *Staphylococcus aureus*. Elles n'ont cependant aucune action contre le staphylocoque aureus résistant à la méticilline (SARM). [47]

#### 2.3.1.1.1.3. Pénicillines A ou aminopénicillines :

Ont un spectre qui s'élargit vers les Gram négatifs. On peut citer l'ampicilline et l'amoxicilline. Elles sont encore largement utilisées notamment cause de leur excellente diffusion, mais elles restent sensibles aux  $\beta$ - lactamases [48].

L'amoxicilline et l'ampicilline sont les deux bêta-lactamines utilisés en production avicole (en raison de leur large spectre) [49]. Ils sont classiquement indiqués dans les affections gastro-intestinales chez les volailles, dans le traitement de la maladie respiratoire chronique et le coryza infectieux des oiseaux [50][51]

#### 2.3.1.1.1.4. Carbapénèmes :

Le représentant est l'imipénème, il est très actif sur un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif, il est résistant à la plupart des bêta lactamases, y compris les BLSE, il est cependant inactif sur les staphylocoques méti-R. [10]. Réservé à la médecine humaine

#### 2.3.1.1.2. Les céphalosporines :

Ce sont des dérivés semi synthétiques de la céphalosporine C isolée d'un céphalosporium. Les céphalosporines ont un spectre plus large que les pénicillines et résistent aux pénicillinases. [47]. Elles ne sont pas utilisées en aviculture [51]

#### 2.3.1.1.2.1. Les céphalosporines de première génération :

(céfalotine, céfalexine, céfazoline...) comprennent des produits surtout actifs sur les Gram positif exception faite des entérocoques et des MRSA. Elles possèdent une activité limitée sur certaines espèces de bacilles Gram (-) tels que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*. [52]

#### 2.3.1.1.2.2. Les céphalosporines de deuxième génération :

Ont un spectre élargi vers les bactéries à Gram négatif, en particulier *Proteus* et *Enterobacter*. Elles sont également bien actives sur *Haemophilus influenzae* et sur les gonocoques. [52] [53]

#### 2.3.1.1.2.3. Les céphalosporines de troisième génération :

Elles constituent un groupe de très nombreux produits surtout actifs sur les Gram négatif avec des CMI basses. Elles sont résistantes à beaucoup de  $\beta$ -lactamases et ont une très bonne diffusion dans de nombreux sites inaccessibles aux autres céphalosporines [52]

#### 2.3.1.1.2.4. Les céphalosporines plus récentes de quatrième génération :

(céfépime, cefpirome) se montrent plus actives vis-à-vis des souches hyperproductrices de céphalosporinase. Elles couvrent les Gram (-), y compris *Pseudomonas aeruginosa*, mais aussi les Gram (+). Elles conservent à l'heure actuelle une activité sur certaines espèces devenues résistantes aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération [10] [52]

#### 2.3.1.2. Glycopeptides :

Ils se fixent de manière non covalente sur la partie D-Ala-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane. De ce fait la polymérisation est inhibée. Ils sont bactéricides. [10] [53]

Ce groupe comprend la vancomycine et la teicoplanine. Ces antibiotiques n'agissent que sur les bactéries à Gram positif et sont surtout utilisés en milieu hospitalier notamment pour traiter les infections à staphylocoques méti-R. [10][52]

### 2.3.1.3. Fosfomycine

Elle agit à une phase précoce intra cytoplasmique, de la synthèse du peptidoglycane, elle se fixe de manière covalente sur une enzyme impliquée dans la formation de l'acide N-acétyl-muramique qui est l'un des composants du précurseur du peptidoglycane. Elle possède un large spectre et elle est parfois employée pour le traitement d'infections à staphylocoques en médecine humaine. [10][54]

## 2.3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique :

### 2.3.2.1. Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome :

#### 2.3.2.1.1. Aminosides :

Ils se fixent sur la sous-unité 30S des ribosomes et perturbent ainsi la lecture des ARNm. Dans ces conditions, la bactérie synthétise des protéines non fonctionnelles. [47]

Les aminosides ne se fixent pas sur les ribosomes des cellules eucaryotes, ce qui en fait des inhibiteurs spécifiques de la synthèse protéique bactérienne. [53]

Ils sont bactéricides et leur activité étant, concentration dépendante. Ils possèdent un large spectre, mais ils sont surtout actifs sur les bactéries à Gram négatif et les mycobactéries. Le premier antibiotique de cette famille a été la streptomycine. La gentamycine est réservé à la médecine humaine. [10].

La spectinomycine et la néomycine sont les antibiotiques les plus employées actuellement en aviculture. [49]

### 2.3.2.1.2. Tétracyclines :

Les cyclines ont en commun une structure formée de quatre cycles hexagonaux, par modification de cette structure de base, on a obtenu des produits dont les spectres sont relativement identiques mais dont la pharmacologie est variable. Ce sont des antibiotiques à large spectre, ayant une activité bactériostatique. [24][55]

Il est bien connu que les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en liant le ribosome bactérien, en s'opposant à la liaison du complexe acide aminé - ARNt au complexe ribosome - ARNm, néanmoins pour y arriver, elle doit traverser des systèmes membranaires différents. Les tétracyclines traversent la membrane externe des Gram négatif à travers les porines OmpF et OmpC. [56]

Ils sont très largement utilisés d'où l'émergence de résistance. Néanmoins, elles restent actives sur les bactéries à développement intra cellulaire comme Les *Brucella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* et *Rickettsia*. [10] [52].

L'oxytétracycline et la doxycycline sont les cyclines les plus utilisées actuellement en médecine vétérinaire La doxycycline a une meilleure absorption digestive et une plus longue durée d'action [55]

### 2.3.2.2. Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome :

#### 2.3.2.2.1. Chloramphénicol :

Le chloramphénicol a été le premier antibiotique entièrement obtenu par synthèse. C'est un antibiotique à effet bactériostatique, à large spectre incluant les anaérobies stricts et doué d'une excellente diffusion.

Il a été très utile dans le traitement de la typhoïde, mais en raison de sa toxicité (risque d'aplasie médullaire mortelle) il n'est plus commercialisé [47]. Il a été aussi très utilisé en médecine vétérinaire, mais il a été interdit en 1994. [57]

Il perturbe la synthèse protéique en inhibant la peptidyl transférase de la SU 50S.

#### 2.3.2.2. Les macrolides et apparentés :

Les macrolides ont une structure caractérisée par un macrocycle lactonique à 14 carbones (série de l'érythromycine) ou 16 carbones (série de la leucomycine et spiramycine) sur lequel peuvent être fixés des sucres.

Des dérivés hémisynthétiques des deux séries (à 14 ou 16 carbones) sont régulièrement mis sur le marché. [47]

Les macrolides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur l'ARN ribosomal 23S de la sous-unité 50S. Ils provoquent la dissociation du peptidyl-ARN, ce qui inhibe l'étape de transpeptidation des chaînes peptidiques en croissance.

Les macrolides sont généralement bactériostatiques ou bactéricides à dose suffisante. Ils agissent essentiellement sur les Gram positif, ils sont également actifs contre les *Legionella*, *Chlamydia*, *Campylobacter* et les mycoplasmes.

Ils diffusent remarquablement bien dans les tissus (notamment pulmonaires) et dans le compartiment intracellulaire. [52]

Les lincosamines et les synergistines sont habituellement apparentés aux macrolides, surtout à cause de leur spectre et de leur pharmacologie proches de ces dernières. Les lincosamines sont en plus actifs sur les anaérobies. Les synergistines sont constitués de deux molécules de streptogramines agissant de manière synergique leur permettant d'exercer une action bactéricide, ils sont actifs sur des bactéries multi résistantes comme les staphylocoques méti-R. [47] [54]

Beaucoup de molécules parmi les macrolides, sont utilisés en aviculture, on peut citer l'érythromycine, tylosine, spiramycine, tilmicosine et lincomycine. Ils sont bien tolérés et sont indiqués lors de MRC, mycoplasmoses, coryza infectieux et le choléra aviaire [50]. La josamycine a été retirée du marché en 2014 en raison de la LMR (limite maximale des résidus) non encore établie

#### 2.3.3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques :

##### 2.3.3.1. Sulfamides et triméthoprime :

Les sulfamides sont des analogues de l'acide para-aminobenzoïque. Ils inhibent la synthèse des folates en inhibant la dihydroptérate synthétase.

Les diaminopyrimidines, inhibent la synthèse des folates en inhibant la dihydrofolate réductase. On les divisera en classes de demi-vie : moyenne (triméthoprime), ultralongue (pyriméthamine), c'est des agents antimicrobiens à large spectre. [10]

Les diaminopyrimidines et les sulfamides agissent à deux niveaux différents de la synthèse des folates ce qui leur assure un effet synergique. [56] [57]. Ils sont utilisés pour le traitement des colibacilloses, pasteurelloses, salmonelloses et dans le traitement non spécifique des coccidioses. [50]

#### 2.3.3.2. Quinolones :

Cette famille d'antibiotiques bloque l'ADN gyrase (cible principale des Gram-) dont le rôle est d'assurer le surenroulement en super-hélice de l'ADN du chromosome bactérien, et de la topoisomérase VI (cible principale des Gram+). [10][54]

Les quinolones de 1ère génération, dont le chef de file est l'acide nalidixique n'agissent que sur les bacilles à Gram négatif.

Les quinolones de 2ème génération ou fluoroquinolones comprennent principalement l'enrofloxacin, la marbofloxacin. Elles sont actives sur les Gram négatif mais chez les Gram positif, leur activité est variable. [53]

#### 2.3.3.3. Nitro-imidazoles :

Dont le chef de file est le métronidazole, utilisé initialement comme antiparasitaire, il exerce une activité bactéricide vis-à-vis des bactéries anaérobies et micro aérophiiles. Il existe aussi le dimétridazole et le ranidazole, ils sont interdits en élevage, car ils sont potentiellement mutagènes et carcinogènes. [10] [57]

#### 2.3.3.4. Rifampicines :

Elles inhibent l'ARN polymérase ADN-dépendante, il en résulte un arrêt de la synthèse des ARN messagers. On l'utilise dans le traitement des infections à staphylocoques. Elle est active également sur les bacilles à Gram positif, sur les *Brucella*, *chlamydia* et *Legionella pneumophila*. [10]

### 2.3.4. Antibiotiques agissant sur les membranes :

#### 2.3.4.1. Polymixines :

Ces antibiotiques ont une structure cyclique formée d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras [10]. Elles agissent de façon non spécifique, comme des tensio-actifs cationiques au niveau de la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif, par interaction hydro et électrostatiques avec les phospholipides (PL) et la fraction lipidique A des lipopolysaccharides. [52]

Ils perturbent ainsi le fonctionnement et la perméabilité membranaire. Plus précisément, les polymyxines entraînent des modifications morphologiques comme la formation de vésicules, puis la membrane cytoplasmique est atteinte, ce qui provoque la fuite de substances intracellulaires et la mort des bactéries. [55]

L'antibiotique le plus utilisé en médecine vétérinaire est la colistine, aussi appelée polymyxine E, elle n'agit que sur les bacilles à Gram négatif, utilisée par voie orale seulement, et elle n'est pas absorbée par voie digestive [57]

Par voie parentérale, sa toxicité est surtout rénale. [10]

#### 2.3.4.2. Nitrofuranes :

Ce sont des produits ayant un large spectre (gram +et -, anaérobies). Ils sont surtout utilisés dans les infections intestinales et urinaires. Dans cette famille on peut citer : la furazolidone, furaltadone et nitrofurantoides. Ils sont interdits en élevage. [10] [57]

### 2.4. Utilisation des antimicrobiens en production aviaire :

Les antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire appartiennent aux mêmes familles. En médecine vétérinaire, les principales familles d'antibiotiques sont utilisables mais, par comparaison avec celui des molécules à usage humain, le nombre de molécules est très restreint.

Tableau 2.1 : tableau récapitulatif des antibiotiques utilisés en aviculture. [50]

Familles d'antibiotiques	Molécules
Betalactamines	Aminopénicillines : Ampicilline et Amoxicilline
Aminosides	Dihydrostreptomycine, Néomycine, Spectinomycine
Quinolones	Enrofloxacin, fluméquine, acide oxolinique
Tétracyclines	Oxy et chlortétracycline, doxycycline
Polypeptides	Colistine (polymyxine E)
Macrolides et apparentés	Érythromycine, Josamycine, Lincomycine, Spiramycine, Tylosine, Tilmicosine
Sulfamides	Sulfadiazine, Sulfadimidine, Sulfadiméthoxine, Sulfaquinoxaline
Diaminopyrimidine	Triméthoprime, pyréméthoxine

On distingue 3 usages principaux des antimicrobiens dans la production aviaire. Les antimicrobiens sont utilisés comme agents thérapeutiques, prophylactiques et promoteurs de croissance.

Le NCCLS, a défini l'utilisation des antibiotiques, ainsi, la thérapie est l'administration d'un ATB à un animal, ou groupe d'animaux qui présentent des signes cliniques francs de pathologies, la prophylaxie est l'administration d'un antibiotique à des animaux en bonne santé et qui sont considérés à risque [58]

L'effet des antimicrobiens sur la croissance des animaux a été découvert dans les années 40, depuis ce temps l'utilisation des antimicrobiens comme promoteurs de croissance a été admise aussi bien en Europe qu'en Amérique du Nord. [59]

En tant que promoteurs de croissance les antimicrobiens sont incorporés directement dans les aliments pour animaux. L'effet des antimicrobiens sur la croissance est liée à leur interaction avec la flore microbienne intestinale.

La Suède a été pionnier dans le bannissement des antimicrobiens comme promoteurs de croissance ensuite plusieurs pays européens ont suivi. L'utilisation des antimicrobiens comme promoteurs de croissance a été banni définitivement en janvier 2006 dans l'Union européenne grâce une directive de 2003. Le bannissement des antimicrobiens comme stimulateur de croissance a eu comme conséquence une diminution générale de l'utilisation des antimicrobiens en élevage aviaire mais une augmentation de l'usage thérapeutique. [60]

L'usage des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et dans la prophylaxie sont les deux principales sources de controverse.

Dans le cadre de la prophylaxie, la charge bactérienne est faible voire nulle. Le but est de protéger l'animal d'une infection potentielle. Cette protection peut être faite systématiquement sur des animaux que l'on juge à une période critique. L'antibioprophylaxie est critiquée, en effet, dans ce cadre les antibiotiques sont choisis pour cibler certaines maladies spécifiques de la période critique. Ils sont utilisés certes à doses thérapeutiques mais par voie per os et sur des temps plus ou moins courts. Ce type d'usage se rapproche du très décrié usage des antibiotiques comme facteurs de croissance. [61].

L'usage des antibiotiques en thérapeutique est le plus concevable tant d'un point de vue scientifique que de celui du grand public. Des bactéries infectent un animal et le vétérinaire le traite pour cette infection.

Ce traitement a pour but de soulager l'animal, de limiter les pertes de productions et de limiter la propagation des bactéries aux autres animaux voire même aux humains. Dans ce cadre là, la charge bactérienne est souvent élevée [61].

La flore intestinale des animaux peut constituer un réservoir de bactéries antibiorésistantes capables d'infecter ou de coloniser les hommes par la chaîne alimentaire. [62]

En effet, les bactéries résistantes de la flore intestinale contaminent les carcasses des animaux abattus comme les bactéries zoonotiques et gagnent le tractus intestinal de l'homme par voie alimentaire. [63]. beaucoup d'études ont été faite pour confirmer cette hypothèse, en 1976, Levy avait observé que des gènes de résistance d'*E.coli* envers la tétracycline isolés chez la volaille ont été retrouvé chez l'homme [64] ; une autre étude de Boggad avait trouvé les mêmes résultats [65]. Ce sujet est toujours source de controverse, car l'étude de la transmission des gènes de résistance de l'animal à l'homme, nécessite une meilleure compréhension des interactions entre les gènes. [66]

## **CHAPITRE 3**

### **ANTIBIORESISTANCE**

Depuis leur découverte et leur utilisation lors de la seconde guerre mondiale, les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité par maladie infectieuse au cours de la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle.

Cependant, l'utilisation massive et bien souvent irraisonnée de ces médicaments, chez l'animal comme chez l'homme, a conduit à l'apparition accélérée de bactéries résistantes aux antibiotiques.

Pendant plusieurs années, les résistances aux antibiotiques n'ont guère inquiété les professionnels malgré leur augmentation constante. En effet, la mise sur le marché régulière de nouveaux antibiotiques plus puissants masquait le phénomène.

A partir des années 80, la découverte de nouveaux antibiotiques s'est ralentie et les risques liés à l'émergence des résistances bactériennes ont commencé à être pris en compte.

Des recherches pour comprendre la dynamique de ces résistances ont été mises en œuvre. Elles ont mis en évidence que celles-ci touchaient autant les bactéries pathogènes que les bactéries commensales, saprophytes et environnementales.

L'antibiorésistance est au cœur des préoccupations scientifiques et politiques depuis une trentaine d'années. Les antibiotiques, base incontournable de la thérapeutique anti-infectieuse, ont été et sont beaucoup utilisés. Cependant, cet usage n'est pas toujours raisonné. Un retour à l'ère pré-antibiotique n'est pas concevable.

#### 3.1. Définition de la résistance aux antibiotiques :

Pour le microbiologiste, la résistance d'une souche à un antibiotique s'évalue par la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet antibiotique vis-à-vis de cette souche. Une souche résistante a une CMI qui est significativement supérieure aux CMI des souches sauvages de la même espèce. [47]

Pour le clinicien, c'est la capacité d'un micro-organisme à survivre à l'action d'un antibiotique, alors qu'il est habituellement sensible à ces concentrations. [67]

La définition proposée Ferron est consensuelle et reprend les différentes idées évoquées ci-dessus : « Une bactérie est résistante à un antibiotique lorsqu'elle supporte des concentrations inhibitrices de cet antibiotique supérieures aux concentrations que l'on peut obtenir dans l'organisme sans atteindre les doses toxiques » [68]

La résistance aux antibiotiques est une réponse physiologique des bactéries à tout usage d'antibiotique [69]. Il est aussi important de noter que les gènes de résistances préexistaient à la découverte des antibiotiques [70]. Dans ses études, Kayser montre que les ancêtres des gènes conférant la résistance codaient des protéines qui avaient initialement un autre rôle que, la résistance aux antibiotiques. [71]

En 2011, une équipe de scientifiques a identifié sur des analyses d'ADN datant de 30 000 ans, un ensemble très diversifié de gènes codant pour la résistance aux bêta-lactamines, tétracyclines et aux antibiotiques glycopeptidiques. Ces gènes présentent des ressemblances avec les variantes modernes. [70]

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise.

- ✓ La résistance naturelle est présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien, elle est liée à son patrimoine génétique.
- ✓ La résistance acquise résulte d'une modification du patrimoine génétique, elle n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre. [10] Cette acquisition peut avoir un support chromosomique (mutation) ou plasmidique (acquisition d'un élément mobile porteur de la résistance). [69]

### 3.2. Transfert horizontal de la résistance :

Les mutations ponctuelles, vont conduire à la production d'une cible altérée ne liant plus l'antibiotique. L'acquisition d'ADN étranger sous forme de plasmides, transposons ou intégrons, se fait, par conjugaison, transformation ou transduction. [72]

### 3.2.1. La conjugaison :

Découverte en 1946, la conjugaison bactérienne fut observée pour la première fois chez *E.coli*, par Joshua Lederberg. Il s'agit du mécanisme de transmission le plus important et le plus fréquemment rencontré. [73]

La conjugaison est un processus par lequel l'ADN est transféré d'une bactérie à une autre par un mécanisme complexe nécessitant un étroit contact cellulaire, le plus connu est le pilus sexuel. La résistance se transmet aux bactéries filles. [74]

### 3.2.2. La transformation :

La transformation est un processus actif qui permet le transfert et l'échange de gènes, ce phénomène naturel est contrôlé par des gènes chromosomiques qui permettent l'absorption d'ADN exogène libre par une cellule compétente. [75] .

Les gènes acquis après transformation doivent être intégrés dans un plasmide ou un chromosome pour être fonctionnel. [76]

Toutefois, la transformation naturelle a ses limites. En effet, outre le peu d'espèces naturellement compétentes, l'ADN exogène doit, pour s'intégrer dans le génome, présenter une séquence très similaire avec l'ADN de la cellule réceptrice. Dans le cas contraire, l'ADN nu sera rapidement dégradé. De ce fait, la transformation jouerait un rôle limité dans le transfert horizontal de gènes de résistances. [73][74]

### 3.2.3. La transduction :

La transduction est un transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire de bactériophage. Il existe deux types de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée. La transduction généralisée résulte d'une erreur lors de l'assemblage d'un phage, lorsqu'un segment de l'hôte est emporté avec le génome du phage. La transduction spécialisée est une caractéristique de certains phages lysogènes, qui sont restés intégrés dans le chromosome de l'hôte. A l'activation, l'excision du génome viral emporte des gènes adjacents. Seules certaines parties du génome bactérien peuvent être transduites. [73][74]

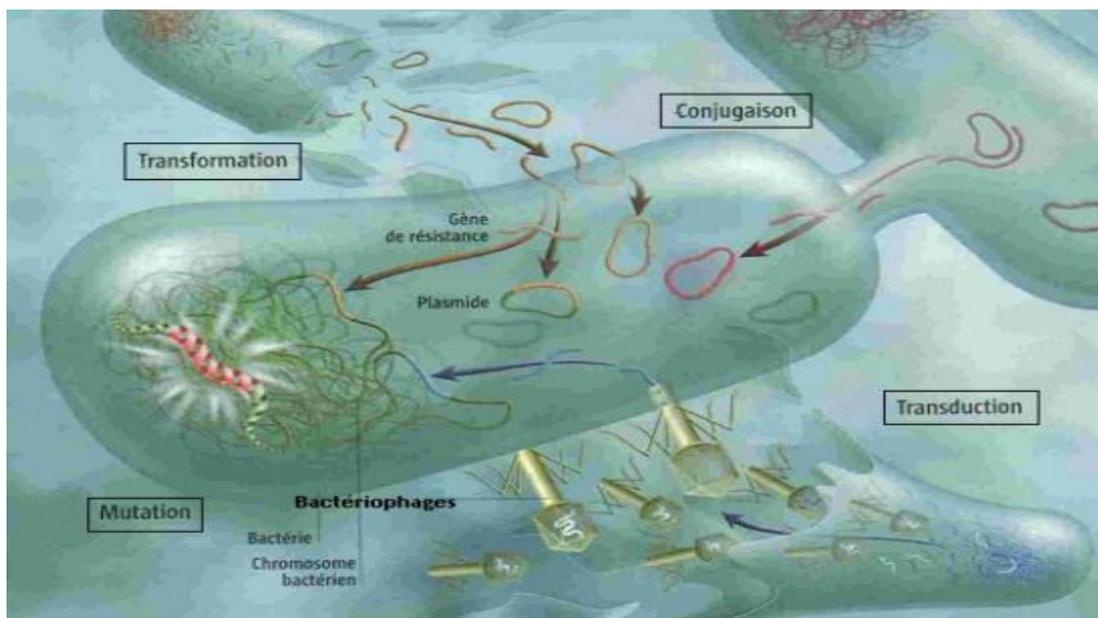


Figure 3.1 : Schéma représentant les mécanismes du transfert horizontal des résistances

### 3.3. Les vecteurs des gènes de résistance :

Les gènes de résistance utilisent les vecteurs qui interviennent dans tous les processus de mobilisation des gènes bactériens :

La résistance aux antibiotiques peut-être inhérente à une espèce ou un genre bactérien (résistance naturelle ou intrinsèque). Par contre, la résistance peut être acquise par certaines souches chez une espèce habituellement sensible à l'antibiotique considéré. Cette acquisition peut-être liée à une mutation d'un gène déjà présent chez la bactérie ou à l'acquisition d'un nouvel ADN porté par un élément mobile, plasmide ou transposon. [69]

#### 3.3.1. Les plasmides de résistance :

Les plasmides sont des éléments génétiques circulaires extra-chromosomiques, qui portent des gènes nécessaires pour le transfert de l'ADN par conjugaison, ainsi, ils peuvent contribuer à la mobilisation d'autres éléments génétiques qui portent des gènes de résistance.

Les plasmides de résistance aux antibiotiques des *E. coli* expliquent une grande partie des multi-résistances chez *E. coli*. [47]

### 3.3.2. Les transposons :

Ce sont des éléments génétiques mobiles constitués d'une zone centrale contenant un nombre limité de gènes, flanquée de deux séquences d'insertion (IS) qui contiennent toute l'information nécessaire à la transposition c'est à dire pour rendre mobile cet élément génétique. [47]. A la différence de la recombinaison classique, la transposition s'effectue en l'absence d'homologie génétique entre l'élément transposable et la séquence d'ADN cible. [45]

### 3.3.3. Intégrons :

Les intégrons sont de nouveaux éléments génétiques décrits pour la première fois en 1989. [45]

Ce sont de petites unités génétiques constituées d'un gène d'intégration codant l'insertion de l'élément dans une région génomique, d'un gène de résistance ou d'un promoteur fort. Ils constituent donc, un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrées ou excisées par un mécanisme de recombinaison spécifique de site médié par une intégrase présente sur l'intégron. [47]

On parle de **résistance croisée** quand la résistance conférée par ce seul gène de résistance concerne plusieurs molécules appartenant à la même famille ou à des familles différentes. Par exemple, la résistance à la méticilline des staphylocoques due à la production d'une nouvelle protéine liant les pénicillines (PLP2a) est une résistance croisée envers toutes les molécules appartenant à la famille des bêta-lactamines.

Quand plusieurs gènes de résistance à différentes molécules ou familles d'antibiotiques s'associent au sein d'une structure génétique tel qu'un transposon, un plasmide ou un intégron, on parle alors de **co-résistance** aux antibiotiques. Quand ces résistances sont transférables, elles sont généralement transférées en bloc.

L'utilisation d'un des antibiotiques pour lequel la bactérie est résistante sélectionnera en même temps, les autres gènes de résistance. Ce phénomène est

appelé **co-sélection**. Les gènes associés dans ces structures peuvent concerner la résistance aux antibiotiques mais aussi d'autres mécanismes tels que la résistance aux métaux lourds ou l'adaptation à certains milieux particuliers. Des conditions, autres que les traitements antibiotiques peuvent être, dès lors, sélectionnants dans certains environnements tels que les sols pollués ou les rivières.[52] [69]

### 3.4..Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

On peut classer les mécanismes de résistance en 4 groupes, mais il est bien clair que la situation est en constante évolution.

#### 3.4.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

##### 3.4.1.1. Enzymes inactivant les bêtalactamines : Les $\beta$ -lactamases :

Elles catalysent l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame. On distingue 4 classes selon le schéma d'Ambler : A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active tandis que celles de classe B sont appelées métallo- $\beta$ -lactamases (carbapénèmases) [77]

Classe A: enzymes caractérisées par la présence d'une sérine dans leur site actif, qui dégradent préférentiellement les pénicillines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique.

Classe B: métallo-enzymes qui ne sont actifs qu'en présence de  $Zn^{2+}$ . Ils sont donc inhibés par des agents chélateurs. Ces enzymes ont généralement un large spectre d'activité.

Classe C: enzymes à sérine, présentant surtout une activité sur les céphalosporines. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique.

Classe D: enzymes à sérine, ces enzymes agissent principalement sur les pénicillines ; elles sont variablement inhibées par l'acide clavulanique. [52] [77]

#### 3.4.1.1.1. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamases :

Les  $\beta$ -lactamases ont une structure proche des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane de la bactérie.

Le mode d'action des  $\beta$ -lactamines sur une bactérie sensible consiste à entraîner une erreur des peptidases aboutissant à un défaut de synthèse du peptidoglycane, ce qui provoque la mort bactérienne. Pour éviter que les peptidases ne se « trompent », la bactérie synthétise une  $\beta$ -lactamase qui va hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame. Son ouverture va empêcher sa reconnaissance par la peptidase et donc la synthèse du peptidoglycane est possible: la multiplication bactérienne n'est alors pas affectée. [78]

En effet, les  $\beta$ -lactamases les plus efficaces hydrolysent 1000  $\beta$ -lactames par seconde, rendant l'antibiotique totalement inactif et régénérant l'enzyme pour une nouvelle réaction d'hydrolyse. [79]

#### 3.4.1.1.2. Classification des $\beta$ -lactamases :

##### 3.4.1.1.2.1 Les céphalosporinases :

Les céphalosporines sont leurs substrats préférentiels :

Ces enzymes se fixent sur les substrats en les hydrolysant ou en bloquant leur fixation ultérieure sur les PLP. Les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (IBL) comme l'acide clavulanique n'inhibent pas ces enzymes.

Les gènes codant pour ces enzymes sont naturellement présents chez beaucoup d'entérobactéries et certains Actinobacter et Pseudomonas.

Ces enzymes peuvent être produites à bas niveau par les souches sauvages (céphalosporinase de bas niveau ou réprimée). Une mutation sur les gènes régulateurs aboutit à une hyperproduction de ces enzymes (céphalosporinase de haut niveau ou dérprimée). [47]

#### 3.4.1.1.2.2. Les carbapénémases :

Ces enzymes hydrolysent la plupart des  $\beta$ -lactames y compris les carbapénèmes et sont classées en 4 classes de molécules, les classes A et B étant les plus fréquentes.[47] Les carbapénémases de la classe A sont chromosomiques à l'exception de l'enzyme KPC qui a un support plasmidique, et qui est l'enzyme la plus répandue chez les entérobactéries. Ces enzymes ont principalement été décrites chez *Klebsiella pneumoniae*. [80]

#### 3.4.1.1.2.3. Les pénicillinases :

Ces enzymes sont codées par des plasmides et sont donc facilement transférables. Elles sont surtout actives sur les pénicillines mais certaines hydrolysent aussi des céphalosporines. Les IBL inhibent au moins partiellement l'activité de ces enzymes. Ils s'expriment en l'absence de tout inducteur (sauf pour les pénicillinases de staphylocoques induites par les pénicillines). [47]

Les enzymes produites sont très nombreuses et désignées par des sigles qui rappellent, soit le nom du patient chez lequel elles ont été isolées la première fois, soit leur profil d'activité (TEM 1 à 26, CARB, OXA, SHV, PSE, ROB, MEN...). Environ 75% de B-lactamases isolées des entérobactéries sont des TEM-1. [81]

#### 3.4.1.1.2.4. $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) :

Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes, appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler. [82]

La majorité des BLSE sont dérivées de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des 1<sup>ère</sup>  $\beta$ -lactamases connues (TEM-1, TEM-2 et SHV-1). [83].

Plus de 200 BLSE naturelles ont été décrites; elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquence d'acides aminés: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA. Les 4 familles majeures sont représentées par les enzymes de type TEM, SHV, OXA et CTX-M. [84].

Les CTX-M pourraient représenter très prochainement les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial. [77]

#### 3.4.1.2. Les enzymes inactivant les aminoglycosides :

C'est une résistance acquise des staphylocoques et des bacilles à Gram -. Ces bactéries peuvent synthétiser des enzymes qui vont modifier la structure de l'aminoside, par phosphorylation, nucléotidylation d'un groupement OH ou acétylation d'un groupement NH<sub>2</sub>. [45]

Plusieurs enzymes distincts peuvent inactiver une même position sur la molécule d'aminoglycoside, et une même bactérie peut posséder les gènes codant pour plusieurs enzymes. Ces gènes sont parfois localisés sur le chromosome (éventuellement, sur des transposons) mais sont le plus souvent portés par des plasmides transférables. [52] [69]

Les bactéries des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* ont une résistance naturelle aux aminosides due au fait que les aminosides traversent mal la membrane cytoplasmique de ces bactéries. Cette résistance est de faible niveau et n'empêche pas la synergie avec les  $\beta$ -lactamines de s'exercer.

Lorsque ces bactéries acquièrent des enzymes inactivant les aminosides, on observe alors une résistance de haut niveau entraînant une perte de la synergie avec les  $\beta$ -lactamines. [10]

#### 3.4.1.3. Enzymes inactivant le chloramphénicol :

La chloramphénicol-acétylase confère la résistance de Gram (+) et (-) au chloramphénicol. L'usage de cet antibiotique étant très limité, l'impact de ce type de résistance est faible. Ce gène est par contre utilisé comme outil en biologie moléculaire. [52]

#### 3.4.1.4. Enzymes inactivant les macrolides, lincosamides et synergistines (MLS) :

L'érythromycine estérase inactive le cycle lactone de l'érythromycine. Ce mode de résistance plasmidique est toutefois assez rare. [52]

### 3.4.2. Modification de la cible :

#### 3.4.2.1. Modification des PLP (protéine liant la pénicilline) :

La résistance à la méticilline et à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines chez *Staphylococcus aureus* est due à la présence d'une PLP ayant une très faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette nouvelle PLP est due à l'acquisition d'un gène chromosomique mobile ou cassette appelé *mecA*. Un autre gène de résistance est apparu ultérieurement, c'est le gène *mecC*, il présente 70% d'homologie avec le gène *mecA*. [10] [52]

La baisse de sensibilité aux  $\beta$ -lactamines chez le pneumocoque et chez les *Neisseria* est due à une diminution de l'affinité de certaines PLP pour les  $\beta$ -lactamines. Cette modification résulte de l'acquisition de fragments d'ADN étranger au niveau des gènes PLP, donnant naissance à des gènes mosaïques.

#### 3.4.2.2. Modification du précurseur du peptidoglycane :

Les résistances aux glycopeptides chez les entérocoques sont dues au remplacement de la D-Ala terminale par un groupement lactate ou sérine sur le précurseur du peptidoglycane. L'affinité des glycopeptides pour la séquence D-Ala-D-lactate est en effet beaucoup plus faible que pour la séquence habituelle D-Ala-D-Ala. Ces modifications sont dues à la synthèse d'enzymes codées par des opérons. Il existe 9 types d'opérons chez les entérocoques. [52][69]

#### 3.4.2.3. Modification de la cible ribosomale :

Elle induit une résistance par diminution d'affinité des MLS pour leur cible, cette modification est due ; soit, par production d'une méthylase codée par des gènes (*erm*) plasmidique ou transposable, qui va induire la méthylation d'une adénine au niveau de l'ARN ribosomal 23S, entraînant une résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramines B d'où le nom MLSB ; soit, rarement, par des mutations portant sur l'ARN ribosomal 23S ou sur des protéines ribosomales. [45]

#### 3.4.2.3. Modification des topoisomérases :

Des mutations siégeant en général au niveau des gènes de la gyrase (gyrA surtout) entraînent une élévation des CMI qui concerne, à des degrés divers, l'ensemble des quinolones. La fréquence de ces mutations est assez élevée, de sorte que la sélection de mutants résistants au cours d'un traitement par les quinolones est un phénomène courant [10]. La mutation de ces gènes (cible préférentielle des Gram négatif) provoque une résistance de bas niveau.

Les mutations au niveau des gènes de la topoisomérase VI (cible préférentielle des Gram positif) génèrent une résistance de haut niveau. [45]

#### 3.4.2.4. Modification du facteur d'élongation :

Elles entraînent une résistance à l'acide fusidique par mutation chromosomique du gène fusA. Ces mutations sont fréquentes, c'est pourquoi il est déconseillé d'utiliser le produit en monothérapie.[10]

#### 3.4.2.5. Modification des enzymes impliqués dans la synthèse des folates :

Des modifications quantitatives et qualitatives de la dihydroptérate synthétase (DHPS) peuvent diminuer l'affinité pour les sulfamides et entraîner une résistance à ces produits. De même, des modifications de dihydrofolate réductase (DHFR) peuvent entraîner une résistance au triméthoprim. [10] [45]

#### 3.4.3. Diminution de la perméabilité :

Les porines sont des protéines membranaires formant des pores ou canaux dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif et permettant le passage de certaines molécules hydrophiles.

Un des mécanismes de défense de première ligne utilisé par les micro-organismes contre les antibiotiques consiste à réduire leur perméabilité externe en réduisant le nombre de porines présentes à la surface de la cellule.

Cette stratégie est un mécanisme de résistance général, qui n'est pas spécifique d'une classe d'antibiotique particulière. [69]

La fosfomycine pénètre dans le cytoplasme des bactéries par l'intermédiaire du système de transport des glycéro-phosphates. Des mutations au niveau de ce système entraînent la résistance à la fosfomycine. De même, une mutation de l'OmpF entraîne une modification de la membrane externe causant l'augmentation du double de la valeur de la CMI des quinolones. [10] [45]

#### 3.4.4. Excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux :

Il existe chez les bactéries des systèmes permettant d'excréter certains antibiotiques. Ce sont des protéines qui agissent comme des pompes, insérées dans la membrane cytoplasmique et externe, elles expulsent les antibiotiques dans le milieu extérieur en utilisant l'énergie produite par la membrane cytoplasmique. [10] [45]

Ces systèmes jouent un rôle dans la résistance naturelle. Sous l'effet de mutations, leur niveau d'expression peut augmenter et faire apparaître une résistance acquise à plusieurs familles d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones, tétracycline...). [10]

Il existe 2 types de pompes responsables chez le *Staphylococcus spp*, d'une résistance aux macrolides, et 3 types de pompes responsables chez *Pseudomonas* d'une résistance au triméthoprime. [45]

Les expressions élevées des pompes à efflux ont été observées chez *Escherichia coli* et *Salmonella spp*. dans l'alimentation des animaux. [85]

### 3.5. Mécanismes de résistance d'*Escherichia coli* aux antibiotiques :

#### 3.5.1. Résistance à la fluoroquinolone :

La résistance à la fluoroquinolone des souches d'*E.coli* est plus souvent associée à la mutation qui touche des acides aminés des sous-unités A B ((gyrA) (gyrB)) de l'ADN gyrase et de la sous-unité (parC) de la topoisomérase. [86]

Une étude réalisée par Baucheron, montre que sur 45 isolats d'*Escherichia coli* aviaires, deux mécanismes de résistance ont été mis en évidence, un mécanisme spécifique aux quinolones, du à un cumul de mutations dans les gènes cibles *gyrA* et *parC*, ainsi qu'un mécanisme plurispécifique d'efflux conférant une résistance multiple à différentes familles d'antibiotiques, caractérisé par l'expression du système d'efflux AcrAB-TolC. [87]

### 3.5.2. Résistance aux $\beta$ -lactamines :

L'imperméabilité de la membrane externe et les pompes à efflux jouent en synergie un rôle important dans la résistance intrinsèque de ces bactéries. [85]

La résistance par modification des PLP reste très rare chez les entérobactéries.[88]

La résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines est due principalement à la production d'enzymes ( $\beta$ -lactamases). En général, les enzymes de type TEM et OXA-1 codées par des gènes plasmidiques sont les principales  $\beta$ -lactamases impliqués dans la résistance aux pénicillines. [88]

### 3.5.3. Résistance aux sulfamides/triméthoprimine :

De toutes les familles d'antibiotiques, l'association sulfamide-triméthoprimine possède indiscutablement la plus grande diversité de mécanismes de résistance acquise et de leur support génétique: modification de la perméabilité, activation de pompes d'efflux, modification quantitative ou qualitative des cibles, contournement métabolique, hyperproduction de précurseurs, absence de certaines enzymes et toute une variété de gènes exogènes acquis par la bactérie [89].

L'intégron de classe 1 est trouvé dans environ 70% des souches d'*E.coli* résistantes aux TMP-STX. De plus, les intégrons de classe 1 contiennent un gène indépendant *sulR* qui code pour la résistance aux sulfamides par surexpression de la dihydroptérate synthétase. [90]

#### 3.5.4. Résistance aux aminosides :

Le mécanisme de résistance d'*Escherichia coli* aux aminosides est du à la production d'enzymes modifiant la molécule active et conduisant à la baisse de l'activité de l'antibiotique, ceci est médié par les gènes *aac3*, *aac6* et *aad*. [91]

Parmi les souches d'*E.coli*, les principaux gènes qui codent pour la résistance à la streptomycine sont *strA*, *strB* et *aadA*, ces gènes codent aussi pour la résistance à la spectinomycine. En outre, une attention particulière est souvent accordée à la présence du gène *aadA* qui est associé à l'intégron 1 chez les souches d'*E.coli*, et l'intégron 1 est responsable en partie de la multi-résistance chez les *Escherichia coli* et les autres entérobactéries. [92]

#### 3.5.4. Résistance à la tétracycline :

La tétracycline inhibe la liaison de l'aminoacyl-tRNA à la sous-unité 30S du ribosome bactérien et ainsi inhiber la synthèse protéique. [56]

La résistance à la tétracycline est codée par plus d'une trentaine de gènes différents mais les plus courants sont compris entre *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* et *tetE*. portés par des plasmides ou des transposons, qui codent pour un mécanisme d'efflux qui augmente l'excrétion de l'antibiotique, et des protéines qui protègent les ribosomes de la bactérie. Ce sont les mêmes protéines qui codent aussi pour la résistance à la doxycycline [93].

## CHAPITRE 4

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### 4.1. Objectif de l'étude

L'objectif de l'étude est l'isolement, l'identification et le sérotypage des souches d'*Escherichia coli* responsables de pathologies chez le poulet de chair et d'évaluer leur fréquence de résistances, vis-à-vis de 13 molécules d'antibiotiques, parmi les plus utilisées en aviculture.

#### 4.2. Région et période de l'étude

L'étude a été réalisée au niveau de la wilaya d'Ain Defla. Les sites choisis ont porté sur des cabinets vétérinaires dont les activités sont principalement axées sur l'aviculture. Les cabinets qui ont acceptés de se soumettre à ce travail sont au nombre de trois. Ces structures reçoivent les cas cliniques et procèdent aux autopsies des volailles. Les échantillons ont été collectés entre janvier et septembre 2014 puis analysés au laboratoire de microbiologie

##### 4.2.1. Présentation de la wilaya d'Ain Defla :

La wilaya d'Ain Defla est située à 145 km au Sud-ouest de la capitale et s'étend sur une superficie de 4544,28 km<sup>2</sup>. Elle se présente comme étant une zone relais entre l'Est et l'Ouest, le Nord et le Sud. [94]



Figure4.1 : Carte géographique de la wilaya de Ain Defla

La wilaya d'Aïn Defla connue par sa vocation agricole arrive à développer plusieurs filières. [95]. Celle de la filière avicole arrive ainsi à produire plus de 6000 tonnes/an de viandes blanches, dont 1000 tonnes au niveau de la SAC Bir Ouled Khelifa (Société des Abattoirs du Centre) qui est dotée d'équipements et d'abattoirs modernes [96]. Ce volume est un indice positif selon les observateurs, car il permet de faire baisser les prix et d'instaurer une régulation du marché. [97]

### 4.3. Matériel et méthodes

#### 4.3.1. Prélèvements

##### 4.3.1.1 Autopsie

Avant chaque autopsie, un examen clinique est réalisé afin de déceler certains éléments de suspicion de la colibacillose comme : l'hétérogénéité des animaux, le retard de croissance, l'abattement et l'anorexie, la diarrhée blanchâtre et le ballonnement de l'abdomen.

L'autopsie a été réalisée selon la procédure classique d'autopsie des volailles. Brièvement, elle a consisté en l'examen externe des cadavres, incision cutanée médiane, dépouillement, ouverture des cavités (abdominale et thoracique), puis l'éviscération. [20]

Ces étapes ont été suivies par l'examen macroscopique proprement dit des tissus et organes afin de détecter les éventuelles modifications lésionnelles (aérosacculite, péricardite, périhépatite, congestion de la rate, péritonite).

##### 4. 3.1.2. Confection des prélèvements

La qualité des résultats bactériologiques dépend étroitement de la qualité du prélèvement. Pour cela, il faut s'assurer que les prélèvements sont réalisés sur des animaux sacrifiés, en évitant la contamination fécale et qu'aucun traitement n'ait été effectué dans les cinq jours précédents le prélèvement.

Les organes prélevés ont été ceux sur lesquels des lésions ont été notées. Il s'agit notamment du foie, du cœur, du poumon et de la rate.



Photo 4.2 : prélèvement des organes [photos personnelles]

#### 4.3.1.3. Conservation des prélèvements

Chaque prélèvement, portait une étiquette sur laquelle, était noté l'âge de l'animal, ainsi que les lésions observées (photo 4.3)

Les organes prélevés ont été introduits dans des flacons stériles et transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire de bactériologie où ils ont été congelés à -20°C.



Photo 4.3 : conservation des prélèvements [photo personnelle]

#### 4.3.2. Bactériologie :

##### 4.3.2.1. Matériel

Tout le matériel nécessaire au bon déroulement de ce travail était disponible au niveau du laboratoire d'analyses médicales de Dr Bendali. Voir appendice B

#### 4.3.2.2. Décongélation des prélèvements

Pour éviter le choc thermique, la veille des analyses, les échantillons sont transférés du congélateur (-20°C) au réfrigérateur (+4°C) puis placés à la température ambiante sur la paillasse de la salle de bactériologie au moins deux heures de temps avant leur utilisation.

#### 4.3.2.3 Découpe des organes

La surface des organes est flambée puis, ils sont découpés en petits morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux et une pince stériles.

#### 4.3.2.4. Pré-enrichissement

Près du bec bunsen, mettre les fragments d'organes dans un tube contenant du bouillon B.H.I.B (bouillon cœur-cerveau). Ces tubes sont incubés à l'étuve à 35°C pendant 18 à 24 heures. Le bouillon cœur-cerveau, milieu nutritif tamponné, est utilisé pour la culture d'une très grande variété de microorganismes aérobies ou anaérobies

#### 4.3.2.5. Ensemencement

Après 24h d'incubation, nous avons prélevé à partir de chaque tube de pré-enrichissement, une goutte à l'aide d'une anse de platine stérilisée à la flamme, que l'on ensemence sur gélose Hecktoen.

La gélose Hecktoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries à partir des prélèvements biologiques

Les différentes boîtes ensemencées sont ensuite incubées à 35°C pendant 18 heures. Les colonies apparues ont été observées sur le plan macroscopique, une colonie jaune saumon a été choisie et ensemencée sur gélose nutritive, et incubée à 35°C pendant 18 heures.

#### 4.3.2.6. Identification des germes

Chaque culture pure a fait l'objet d'une observation de la mobilité selon la méthode (état frais), puis d'une coloration de Gram, et, par la suite a été identifiée grâce à une galerie API 20 E (entérobacteriaceae)

##### 4.3.2.6.1. La galerie API 20 E

Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les substrats. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

- Préparation de la galerie

Répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Inscrire le numéro du prélèvement sur la languette latérale de la boîte. Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- Préparation de l'inoculum

On utilise préférentiellement des cultures jeunes (18 à 24 heures) puis on fait une suspension bactérienne avec de l'eau distillée dans des tubes à hémolyse pour chaque culture en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

- Inoculation de la galerie

Remplir tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.

Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 24 heures.

- Lecture de la galerie

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture. Trois tests nécessitent l'addition de réactifs :

Test Tryptophane Désaminase(TDA) : on ajoute une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Test Indole(IND) : on ajoute une goutte de réactif JAMES. Un anneau rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Test Voges-Proskauer (VP) : on ajoute une goutte de réactif VP 1 et VP 2 puis on attend au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Interprétation de la galerie

L'identification est obtenue à partir du profil numérique : Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1 ; 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres.

#### 4.3.2.7 : conservation des souches

Nous avons pu conserver chacune des souches identifiées dans un milieu gélosé en tube (milieu de conservation de l'Institut Pasteur), en attendant la réception des sérums agglutinants O1, O2 et O78

#### 4.3.3. Sérotypage

Après avoir été isolées et identifiées, les souches d'*Escherichia coli* peuvent être sérotypés par la méthode d'agglutination rapide sur lame qui consiste en une agglutination en utilisant des sérums contenant des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes de la paroi (antigènes O).

Dans cette étude, seuls les antigènes O1, O2 et O78 ont été testés car ils sont considérés selon des données bibliographiques, comme les souches d'*E.coli* pathogènes, les plus fréquents.

Les réactifs utilisés sont à base d'anticorps spécifiques obtenus à partir d'immuns sérums de lapins, et ils proviennent du laboratoire Bio vac santé animale. (Voir Appendice C)

- Principe de la technique :

Déposer une goutte de réactif sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, prélever 3 à 4 colonies. Les mélanger au réactif pendant 5 secondes puis agiter doucement ce mélange pendant 30 secondes. (Photo 4.4)

- Lecture :

La lecture doit être effectuée juste après l'agitation.

- Interprétation des résultats

Avant la lecture, s'assurer de la validité des tests de contrôle des réactifs et de la culture bactérienne. Si lors de ces tests, il apparaît des agglutinats, les résultats ne sont pas interprétables.

Un résultat positif se traduit par la présence d'agglutinats colorés après 30 secondes d'agitation du mélange réactif plus bactéries.

Un résultat négatif se traduit par l'absence d'agglutinats après 30 secondes d'agitation du mélange réactif plus bactéries



Photo 4.4 : réalisation du sérotypage [photo personnelle]

#### 4.3.4. Antibiogramme

##### 4.3.4.1. Principe

L'antibiogramme est la méthode analytique qui permet de définir in vitro l'antibiotique le plus actif sur un germe. La méthode de diffusion en gélose est celle utilisée pour cette étude, selon les normes NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) recommandées par l'OMS. [98]

Cette méthode consiste à déterminer le diamètre du cercle qui correspond à l'aire inhibitrice complète de la croissance bactérienne visible, par les antibiotiques testés.

En les comparant aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture, on peut classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante. (S, I, R).

- Milieu

La gélose Mueller Hinton (MH) est la gélose de choix pour la réalisation de l'antibiogramme standard. après chauffage dans un bain-marie, elle est coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm et séchée avant l'emploi.

- Inoculum

A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire dans les 15min qui suivent la préparation de l'inoculum.

- Ensemencement

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Application des disques d'antibiotiques

Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces pour s'assurer de son application. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé. Les boîtes sont incubées pendant 18 heures à 35°C.

- Lecture

Pour la lecture, il faut mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée. (Photo 4.5)

La lecture des diamètres des zones d'inhibition a été faite selon la table de lecture de la 3ème édition de « Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire ».

La lecture des diamètres des zones d'inhibition pour la doxycycline a été faite selon la table de lecture du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, car ne figurant pas dans la première table. (Appendice D)  
La bactérie est dite sensible à l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la CCI, sa croissance est inhibée par la concentration sérique obtenue au cours d'un traitement à dose habituelle par voie générale.

La bactérie est dite résistante à l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la CCS. La concentration sérique ne pouvant pas atteindre la CMI dans les conditions du traitement, sauf à utiliser des posologies toxiques

La bactérie est dite intermédiaire à l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques. En pratique, cela correspond à une situation où la concentration est tantôt suffisante pour tuer les bactéries, tantôt insuffisante, dans ce cas le succès thérapeutique est imprévisible.



Photo 4.5 : exemple d'antibiogramme sur gélose Mueller-Hinton [photo personnelle]

#### 4.3.4.2. Choix des antibiotiques :

Au total 13 antibiotiques ont été testés, parmi les plus utilisés en élevage aviaire, et selon les listes d'antibiotiques recommandées pour la surveillance des pathogènes vétérinaires , ce sont : ampicilline, amoxicilline + acide clavulanique, colistine, sulfaméthoxazole+ triméthoprime, acide nalidixique, enrofloxacin, fluméquine, gentamycine, chloramphénicol, tétracycline, doxycycline, nitrofurantoïde, céfotaxime.

#### 4.3.4.3. Contrôle de qualité :

Le contrôle de qualité a pour but d'assurer :

- La précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité.
- La performance des réactifs utilisés dans les tests.
- La performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.

Le contrôle de qualité doit se faire à chaque nouveau lot de Mueller Hinton et ou d'antibiotiques. Ce travail de contrôle doit être permanent.

Dans cette étude, la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 est celle utilisée pour le contrôle de qualité

#### 4.3.5. Recherche des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) :

Les  $\beta$ -lactamases sont une vaste famille d'enzymes qui rendent la bactérie résistante aux nouvelles générations de céphalosporines. Ces dernières sont très importantes en médecine humaine car elles constituent l'une des seules alternatives pour le traitement de certaines infections chez l'homme. La synthèse d'une BLSE par les entérobactéries confère à celle-ci une résistance croisée envers toutes les  $\beta$ -lactamines sauf les céphamycine et carbapénèmes

A l'exception des BLSE de type OXA (classe D), les BLSE sont des  $\beta$ -lactamases de classe A (comme TEM1/2 et SHV-1)

Les BLSE sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème et 4ème génération et les monobactames et restent généralement sensibles aux carbapénèmes. Enfin, les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (I $\beta$ L), comme l'acide clavulanique.

La recherche de la  $\beta$ -lactamase à spectre élargi se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme en déposant le disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10 $\mu$ g) à 30mm (centre à centre) d'un disque de céphalosporine de 3ème génération exemple : cefotaxime (CTX 30 $\mu$ g). Incuber 18 heures à 35°C

La détection des BLSE est classiquement basée sur l'observation d'une synergie dite « en bouchon de champagne » entre les disques d'AMC et CTX



Photo 4.6. Disposition des disques d'AMC et CTX [photo personnelle]

#### 4.3.6. Base de données :

Les résultats des isolements, de l'identification, du sérotypage, et de l'étude du profil de sensibilité aux antibiotiques, étaient saisis dans une base de données en utilisant les Logiciels suivants :

- Excel 2007
- Statistica (logiciel statistique)

Les différentes étapes de l'examen bactériologique, sérologique et la recherche de l'antibiorésistance sont résumés sous forme d'un schéma (schéma 4.7)

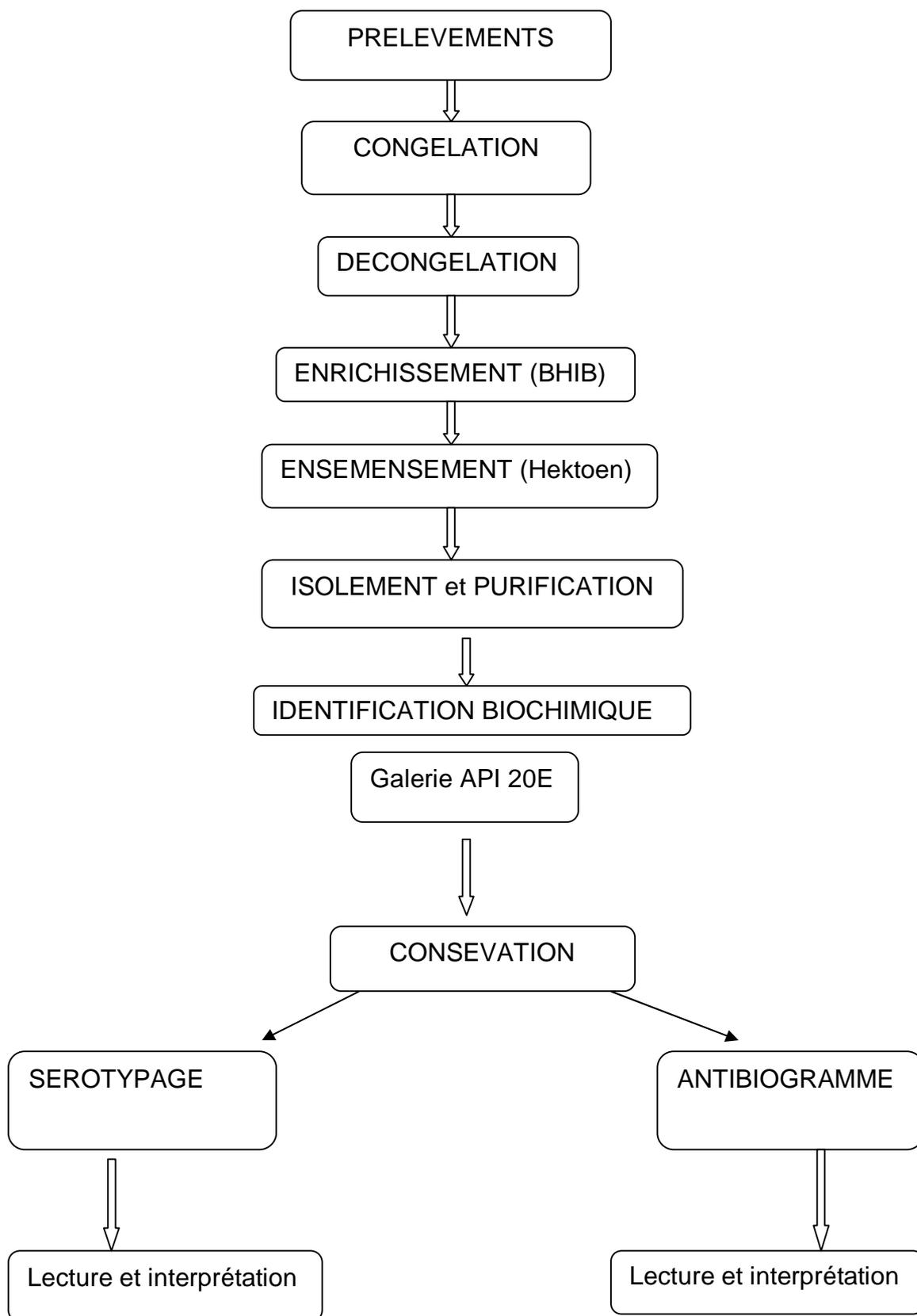


Schéma 4.7 : Les différentes étapes de l'examen bactériologique, sérotypage et antibiogramme

#### 4.4. Résultats

Au total, 180 prélèvements ont été réalisés à partir de différents organes (cœur, foie, poumon et rate), provenant de volailles suspectes de colibacillose. Sur les 180 prélèvements suspects, 156 ont présenté une culture positive envers *Escherichia coli*, ce qui représente 86.66% des prélèvements pathologiques.

Les commémoratifs étaient notés sur une fiche, puis triés en fonction de l'âge, comme le montre le tableau n°4.1.

##### 4.4.1. Distribution des prélèvements en fonction de l'âge :

Les prélèvements sont pratiqués au hasard chez des sujets malades d'âges différents

Tableau 4.1 : Nombre de prélèvements positifs par tranche d'âge.

Tranche d'âge	7 à 21 j	22 à 37 j	38 à 55j
Nombre	49	65	42

Le nombre d'isolats par tranche d'âge est réparti plus ou moins également entre les tranches d'âge {7 à 21j} et {38 à 55j} avec un nombre plus élevé pour la tranche d'âge {22 à 37j} . (Figure 4.8)

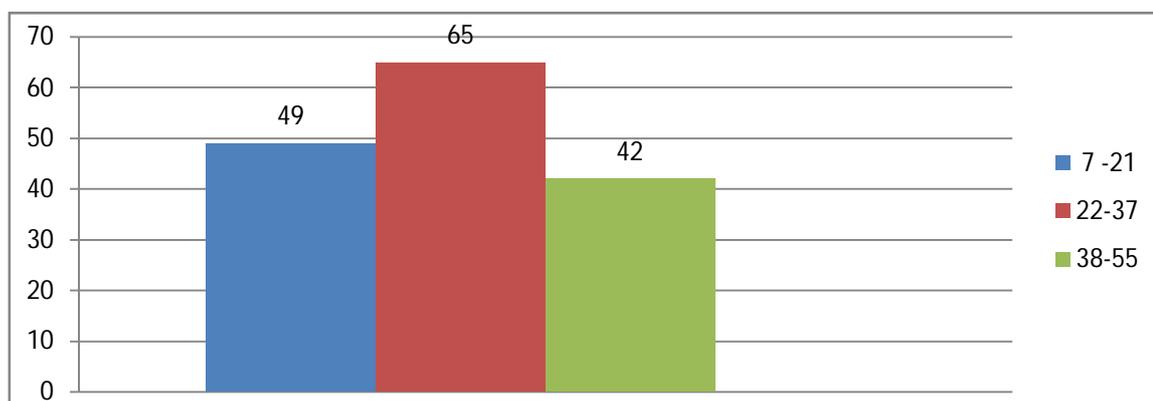


Figure 4.8 : distribution des prélèvements positifs en fonction de l'âge

Nous avons constaté, après analyse des résultats, que la tranche d'âge 22 à 37 jours, présente la proportion la plus importante d'animaux malades (65 sujets atteints), suivi des sujets ayant une moyenne d'âge comprise entre 7 et 21 jours (49 sujets), chez lesquels, nous avons noté une omphalite, des péricardites et périhépatites

#### 4.4.2. Fréquence des différentes lésions retrouvées :

Les différentes lésions retrouvées sont regroupées dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : La fréquence des différentes lésions de colibacillose rencontrées lors de l'examen nécropsique.

Lésions	Pourcentage
Périhépatite	85.89%
Péricardite	79.48%
Aérosacculite fibrineuse	66.02%
Péritonite	53.84%
Congestion de la rate	30.12%
Persistance du sac vitellin	19.87%

La périhépatite, la péricardite et l'aérosacculite sont les lésions les plus fréquemment retrouvées dans notre étude

Les lésions spécifiques de la colibacillose constatées dans cette étude sont visibles sur les photos (4.9 à 4.12) [photos personnelles]

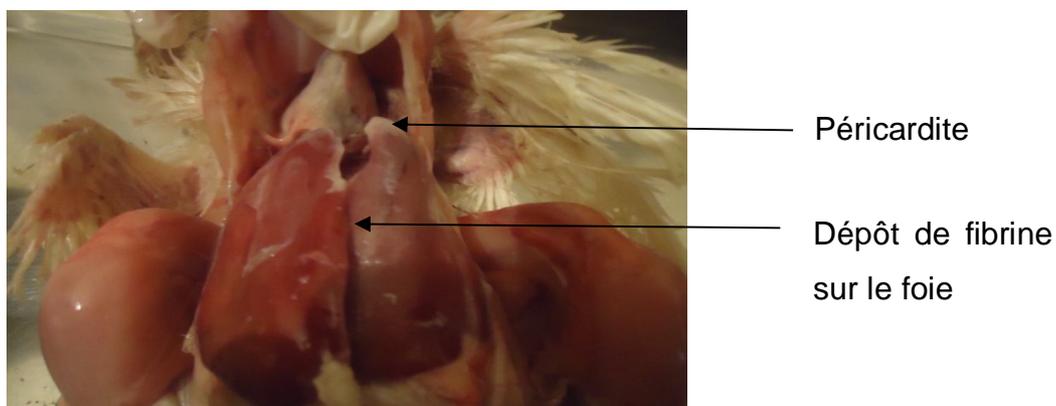


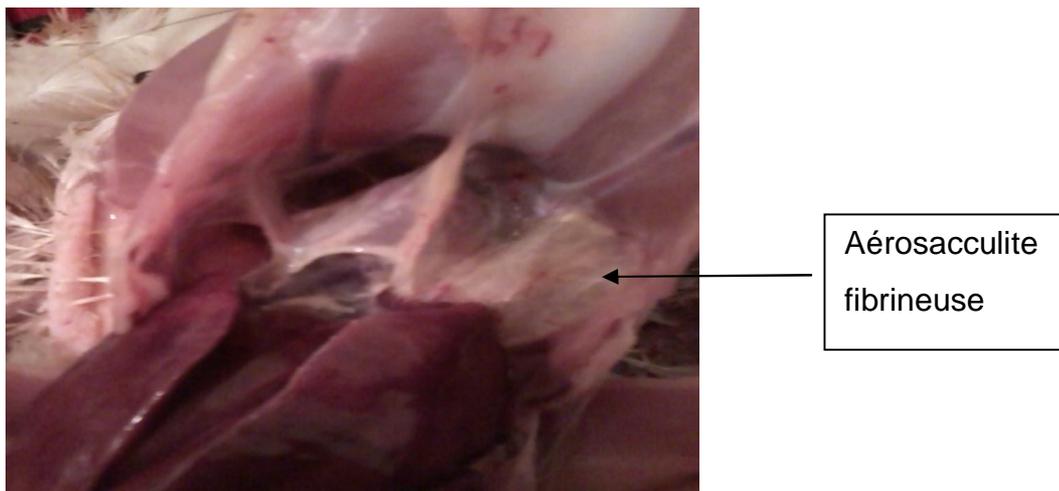
Photo 4.9 : aspect général de la colibacillose



Photo 4.10 : omphalite chez un poussin



Photo 4.11 : aspect d'une péritonite



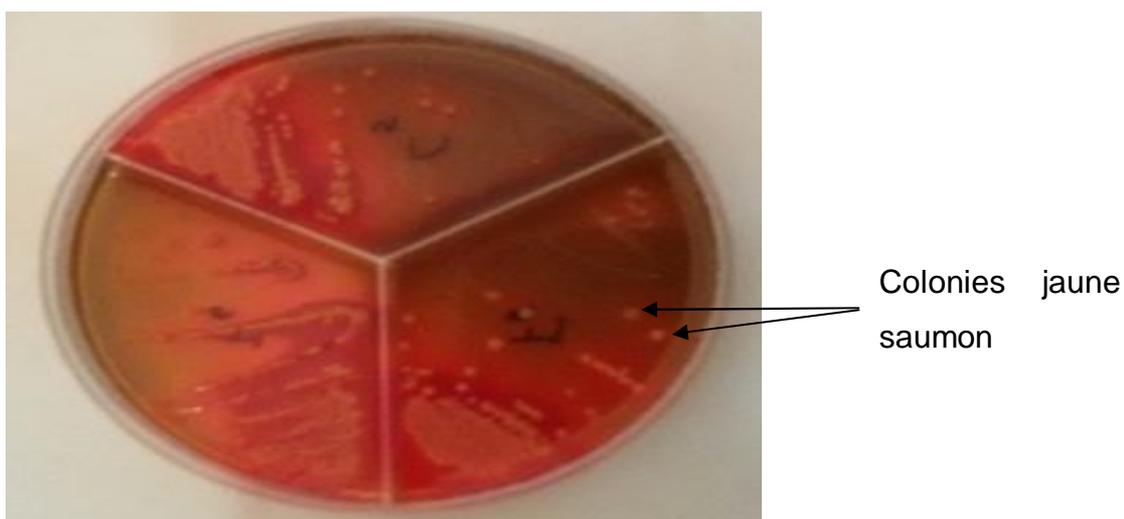
Aérosacculite  
fibrineuse

Photo 4.12 : Aérosacculite fibrineuse

#### 4.4.3. Examen bactériologique :

A partir des 180 prélèvements réalisés, 156 ont présenté une culture positive envers *Escherichia coli* ; les autres isolats concernaient d'autres germes dont certaines ont été identifiées en tant que *Klebsiella*, *Salmonella* ou *Enterobacter*. Les souches d'*Escherichia coli* sont isolées et identifiées grâce à leurs caractères morphologiques et biochimiques.

Sur gélose Hecktoen, les colonies d'*E.coli* sont apparues rondes, bombées, à bords nets, de 2 à 3 mm de diamètre, de couleur jaune saumon (lactose +), comme le montre la photo ci-dessous.



Colonies jaune  
saumon

Photo 4.13 : colonies d'*Escherichia coli* sur gélose Hektoen [photo personnelle]

L'identification est basée aussi, sur l'observation microscopique de bacilles fins, dont la coloration de Gram est négative



Photo 4.14 : observation au microscope optique d'*E.coli*. Gr.10×100

Le test d'orientation rapide, permet d'identifier les *Escherichia coli* en recherchant le profil biochimique suivant : ONPG+, H<sub>2</sub>S -, glucose +, indole + et uréase -.

Les souches identifiées comme *E.coli* présentent le phénotype ci-dessous  
ONPG +, ADH-, LDC+, ODC+, Citrate-, H<sub>2</sub>S-, Urée -, TDA -, Indole +, VP – et la plupart des sucres sont hydrolysés, comme le montre la figure de la plaque Api 20<sup>E</sup> (photo 4.18)



Photo 4.15 : profil biochimique sur galerie API 20E d'*E.coli*[photo personnelle]

#### 4.4.4. Résultat du sérotypage :

Après avoir été identifiés comme *E.coli*, les 156 souches ont été sérotypés, avec les sérums O1, O2 et O78. Ces résultats sont regroupés dans le tableau 4.3

Tableau 4.3 : répartition des sérotypes d'*E.coli*

Sérotypes	O1	O2	O78	Autres
Nombre	23	11	16	106
Pourcentage	15%	7%	10%	68%

Les sérotypes O1, O2 et O78 représentent 32% des isolats, avec 15% pour O1, 10% pour O78 et 7% pour O2. Les souches restantes représentant 68%, n'appartiennent pas à ces 3 sérotypes. Ces résultats sont regroupés sous forme d'un diagramme en secteur

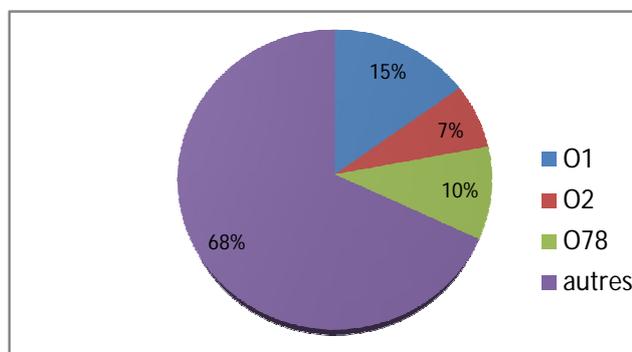


Figure 4.16 : représentation de la proportion des sérotypes

#### 4.4.5. Résultats des antibiogrammes :

L'antibiogramme a été réalisé selon les normes de l'OMS. La fréquence de résistance de 153 souches, vis-à-vis de 13 antibiotiques est présentée dans le tableau 4.4. Les 3 autres souches seront discutés séparément car présentant des profils de bêta-lactamases à spectre élargi.

Tableau 4.4 : résultats des antibiogrammes.

Antibiotique	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Ampicilline	83.01%	2.61%	14.38%
Amoxicilline+ac.clavulanique	43.13%	22.22%	34.64%
Oxytétracycline	94.12%	0	5.88%
Gentamycine	1.96%	0.65%	97.39%
Ac. Nalidixique	85.62%	0.65%	13.73%
Sulfaméthoxazole + Triméthoprim	88.89%	1.31%	9.80%
Colistine sulfate	6.54%	0	93.46%
Chloramphenicol	39.22%	3.27%	57.52%
Doxycycline	75.81%	1.31%	22.88%
Enrofloxacin	86.27%	2.61%	11.11%
Fluméquine	91.50%	0.65%	7.84%
Nitrofurantoïde	0	0	100%
Cefotaxime	0	0	100%

Ces résultats sont représentés sous forme d'histogramme (figure 4.17)

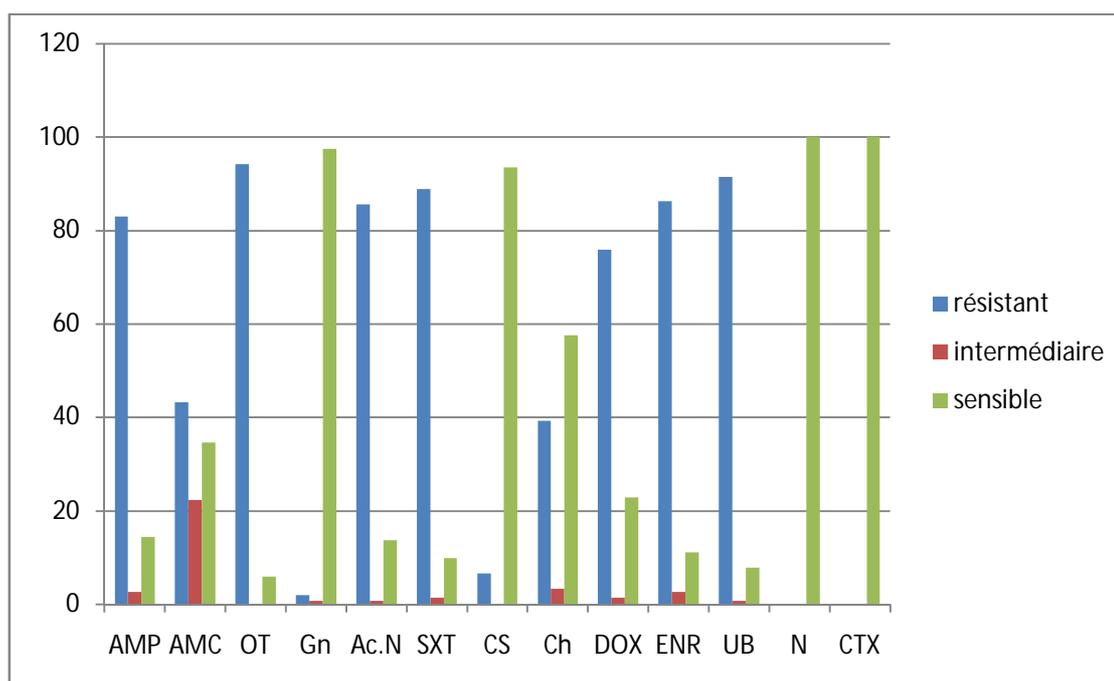


Figure 4.17 : sensibilité globale des souches vis-à-vis des antibiotiques testés

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline+acide clavulanique, OT : oxytétracycline, Gn : gentamycine, Ac.N : acide nalidixique, SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprimine, CS : colistine sulfate, Ch : chloramphenicol, DOX : doxycycline, ENR : enrofloxacin, UB : fluméquine, N : nitrofurantoïde, CTX : céfotaxime

Les résultats que nous avons obtenus sur les résistances aux antibiotiques d'*E.coli* peuvent être classés en trois groupes :

Groupe 1 : comprend des antibiotiques pour lesquels des taux très élevés de résistance sont observés, il s'agit de l'oxytétracycline (94.12%), suivies de la fluméquine avec 91.5% de résistances, sulfaméthoxazole+triméthoprimine (88.89%), enrofloxacin (86.27%), ampicilline (83.01%), acide nalidixique (81.04%) et doxycycline (75.16%).

Groupe 2 : comprend des antibiotiques pour lesquels des taux moyens de résistance sont observés, chloramphénicol (39.22%) et amoxicilline + acide clavulanique (43,13%).

Groupe 3 : comprend des antibiotiques pour lesquels des taux bas de résistance sont observés : colistine sulfate (6.54%), gentamycine (1.96%),

La nitrofurantoïde et la céfotaxime, sont les antibiotiques pour lesquels, il n'y avait pas de résistances.

Les taux de résistance pour les familles les plus anciennes (ampicilline, oxytétracycline, sulfamides et triméthoprim) sont élevées.

Les autres antibiotiques présentant les taux les plus élevés de résistance sont représentés par les quinolones et leurs dérivés (fluméquine, enrofloxacin, acide nalidixique) ainsi que la doxycycline

Le test du khi deux a été utilisé pour confirmer l'indépendance des sérotypes et de la résistance aux antibiotiques. Pour ce fait, les deux groupes de souches (ceux qui appartiennent aux sérotypes O1, O2, O78 et ceux qui n'appartiennent pas à ces 3 sérotypes) ont été comparés sur la base deurs résistances aux antibiotiques. Les résultats sont indiqués dans le tableau 4.5

Tableau 4.5. Résultats des valeurs d'indépendance entre sérotypes et résistance

Antibiotique	AMP	AMC	OT	Ac.N	SXT	CS	CH	DO	ENR	UB
Khi deux	0.0051	0.1874	0.4753	2.4548	1.7973	2.5015	1.4341	0.0013	0.3244	0.5954

Pour la gentamycine, nous avons utilisé le test exact de Fischer, car les valeurs aux colonnes étaient inférieures à 5 (condition d'application du Khi deux)

Il n y a pas de différence significative entre les souches appartenant aux 3 sérotypes (O1, O2 et O78) et ceux qui n'appartiennent pas à ces 3 sérotypes, concernant la résistance et ceci envers tous les antibiotiques testés

Les valeurs du khi deux étaient toutes inférieures à 3.84 (correspond au khi deux inverse avec un risque d'erreur de 5% et une valeur ddl de 1)

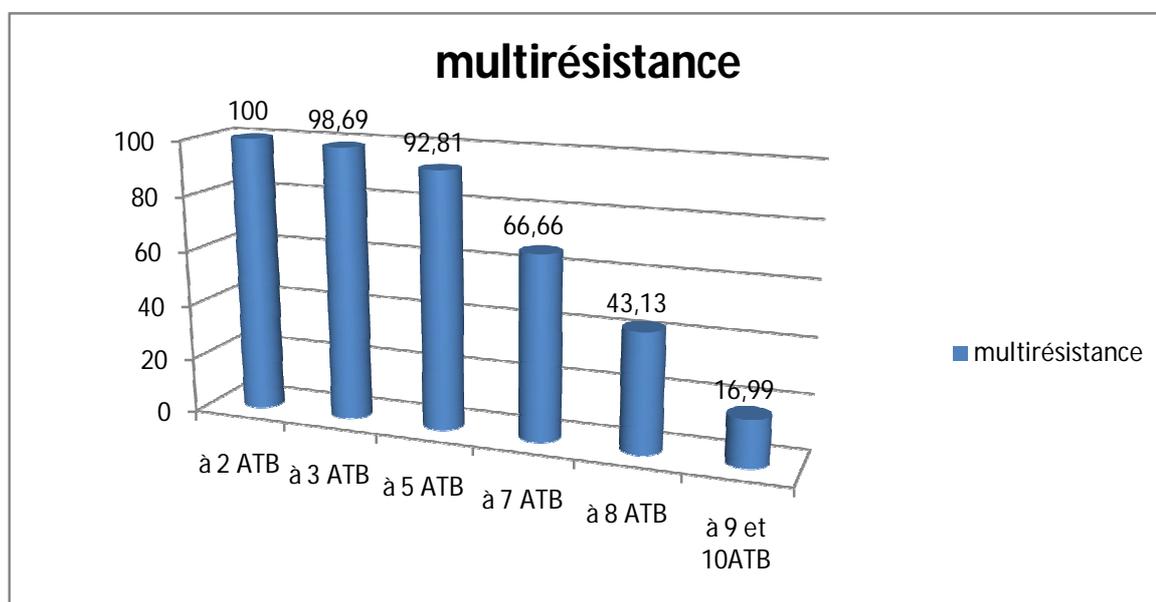
Pour la gentamycine, le test exact de Fisher donne un p de 0.249, ce qui indique qu'il n y a pas de différence significative entre les deux groupes

Parmi les 153 souches d'*Escherichia coli* isolées, 100% des souches sont résistantes à au moins 2 antibiotiques. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.6

Tableau 4.6 : Fréquence des multi résistances d'*E.coli*.

Nombre d'antibiotiques	Pourcentage des souches résistantes
2	100%
3	98.70%
4	95.42%
5	92.81%
6	82.35%
7	66.66%
8	43.13%
9 et 10	16.99%

La multirésistance apparaît comme un véritable problème, car 98.7% des souches sont résistantes à au moins 3 antibiotiques. La plupart des souches, soit, 92.81% sont résistantes à 5 antibiotiques, et près de la moitié sont résistantes à 8 antibiotiques (43.13%). Le 1/6ème des souches sont résistants à 9 et 10 antibiotiques (15.04%). Ces résultats sont représentés sous forme d'histogramme (figure 4.18).

Figure 4.18 : fréquence des multirésistances d'*E.coli*

Au total, 48 profils d'antibiogrammes ont été obtenus dans notre étude, les plus fréquents sont ceux désignés dans le tableau 4.7 et ils sont au nombre de 10

Tableau 4.7 : liste des antibiotypes les plus fréquents des *E.coli* isolés

Antibiotypes											Nb
AMP	AMC	OT	Ac.N	SXT	Cs	Ch	DO	ENR	UB	A	1
AMP	AMC	OT	Ac.N	SXT	Ch	DO	ENR	UB		B	19
AMP	AMC	OT	Ac.N	SXT	DO	ENR	UB			C	18
AMP	OT	Ac.N	SXT	Ch	DO	ENR	UB			D	17
AMP	OT	Ac.N	SXT	DO	ENR	UB				E	17
AMP	AMC	OT	Ac.N	SXT	ENR	UB				F	7
AMP	OT	Ac.N	SXT	ENR	UB					G	5
OT	Ac.N	SXT	DO	ENR	UB					H	8
OT	Ac.N	DO	ENR	UB						I	5
OT	Ac.N	SXT	ENR	UB						J	4

Antibiotype	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
%	0,75	12,41	11,76	11,11	11,11	4,57	3,26	5,22	3,26	2,61

On se doit de considérer le danger émanant des antibiotypes A, B, C, D et E qui représentent à eux seuls 47,04%, soit près de la moitié. Ces antibiotypes sont représentés sous forme de diagramme en secteur

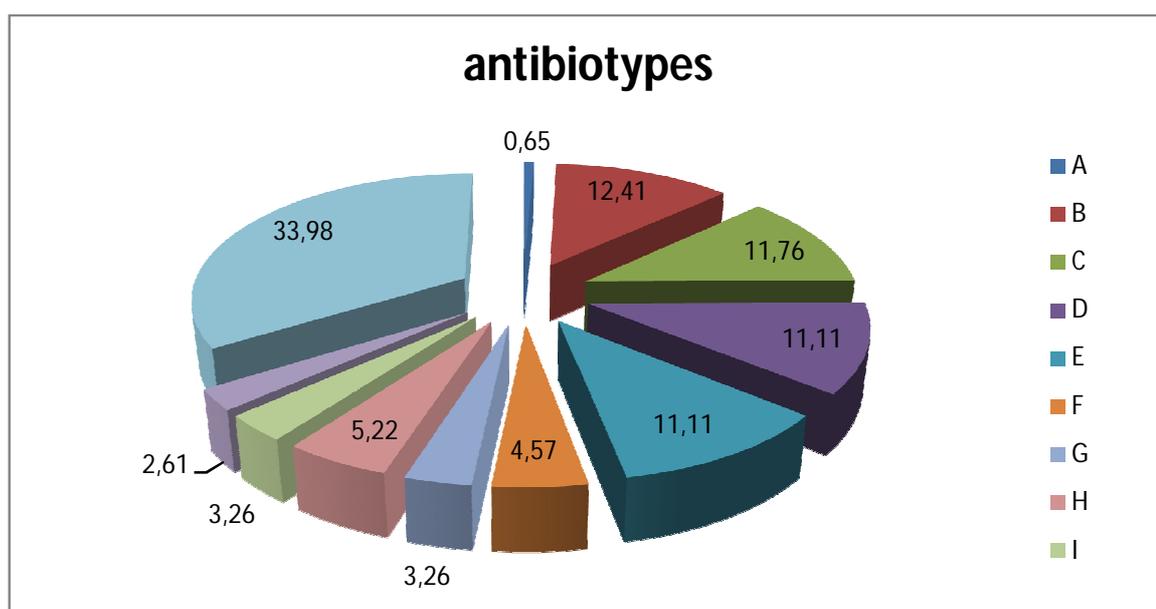


Figure 4.19 : représentation de la proportion des antibiotypes retrouvés

L'antibiotype A (ampicilline, amoxicilline+acide clavulanique, oxytétracycline, acide nalidixique, sulfaméthoxazole-triméthoprimine, chloramphénicol, colistine sulfate, doxycycline, enrofloxacin et fluméquine), bien que ne représentant que 0.65% des isolats réalisés, présente des résistances envers tous les antibiotiques testés sauf à la gentamycine, nitrofurantoïde et céfotaxime, ces derniers ne sont pas utilisés en aviculture.

Les antibiotypes B, C, D et E représentent 46.39% des isolats, et ils présentent tous une résistance envers l'ampicilline, oxytétracycline, acide nalidixique, sulfaméthoxazole-triméthoprimine, doxycycline, enrofloxacin et fluméquine, et qui sont les antibiotiques conventionnels les plus utilisés en aviculture.

Les antibiotypes F, G, H et J, présentent tous une résistance envers l'oxytétracycline, acide nalidixique, sulfaméthoxazole-triméthoprimine, enrofloxacin et fluméquine ; et l'antibiotype I, présente une résistance envers l'oxytétracycline, acide nalidixique, doxycycline, enrofloxacin et fluméquine.

#### 4.4.6. Les BLSE :

Dans notre étude, 3 souches parmi les 156 isolées ont présenté un profil de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) comme indiqué par l'observation d'images de synergie en bouchon de champagne entre le disque d'amoxicilline-acide clavulanique et le disque de céfotaxime (photo 4.20).

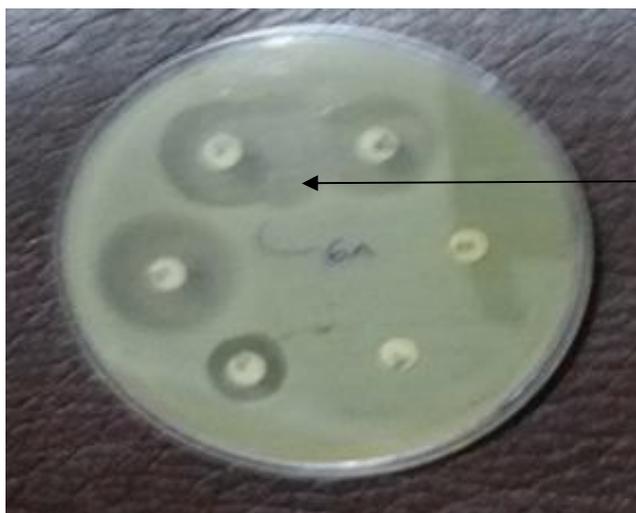


Image en  
bouchon de  
champagne

Photo 4.20 : profil de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi [photo personnelle]

Les phénotypes de résistance de ces souches sont présentés dans le tableau 4.8

Tableau 4.8 : résistances et sensibilités des 3 souches présentant une BLSE

Antibiotique	E 154	E 155	E 156
Cefotaxime	S	S	S
Amoxicilline+ac.clavulanique	S	S	S
Ampicilline	R	R	R
Gentamycine	S	S	S
Ac. Nalidixique	R	R	R
Sulfamide+ triméthoprim	S	R	S
Colistine sulfate	S	S	S
Chloramphenicol	S	S	S
Doxycycline	R	R	R
Enrofloxacin	R	R	R
Fluméquine	R	R	R
Nitrofurantoin	S	S	S
Tétracycline	R	R	R

Ces souches d'*Escherichia coli* BLSE positives, présentent des résistances envers plusieurs familles d'antibiotiques entre autre, les  $\beta$ -lactamines, tétracyclines et quinolones.

#### 4.5. Discussion

Sur un total de 180 prélèvements réalisés à partir d'organes de volailles suspectes de colibacillose, 156 ont présenté une culture positive envers *Escherichia coli* ce qui représente un total de 86.66%.

Le nombre de prélèvements positifs dans la tranche d'âge 7 à 21 jours (49 sujets) est élevé, et les mortalités chez cette tranche d'âge, sont probablement dues à des erreurs d'élevage survenant en amont, car selon GROSS et al [99] les fautes d'hygiène au niveau des couvoirs, constituent l'une des principales causes dans le développement des omphalite, et les mortalités engendrées se poursuivent encore pendant une période de 3 semaines. De plus, les résultats de l'étude de GIOVANARDI et al [100] en 2007, indiquent que la transmission des APEC des reproductrices chair vers le poussin est possible, comme pour *Salmonella typhimurium*.

Les résultats positifs chez les tranches d'âge 22 à 37 jours (65 sujets) et 38 à 55 jours (42 sujets), correspondent probablement à des erreurs techniques dans l'élevage, liés à des facteurs environnementaux (température et humidité) ou à des fautes d'hygiène, entraînant le développement de colibacillose dont les formes les plus rencontrées chez cette tranche d'âge sont la colibacillose respiratoire et la colisepticémie. De plus, selon GROSS et al [99], l'expression principale de la colibacillose respiratoire et de la colisepticémie, est comprise entre 4 et 9 semaines, ceci en accord avec nos résultats.

#### Les lésions :

Dans cette étude, les lésions observées, correspondent principalement à la périhépatite (85.89%), péricardite (79.48%) l'aérosacculite (66.02%), et aussi à la péritonite (53.84%) et moins fréquemment à la congestion de la rate (30.12%) et à la persistance du sac vitellin (19.87%). Des résultats similaires ont été retrouvés dans l'étude de MESSAI et al [101], notamment concernant l'aérosacculite (72.66%), la péricardite (72.66%), la périhépatite (88.66%) avec une nette prédominance de la congestion de la rate (86%)

Les résultats retrouvés dans notre étude sont supérieurs à ceux d'AGGAD et al [102], qui sont l'aérosacculite (40%), la périhépatite (62%) et la péricardite (31%)

### Les sérotypes :

Les sérotypes O1, O2, et O78 représentent 32% des isolats, ce pourcentage correspond aux résultats de SOJKA ET CARNAGHAN [103], qui affirment que ces trois sérotypes représentent 15 à 61% des colibacilloses cliniques.

Dans notre étude, le sérotype O1 représente 15% des isolats, le sérotype O2 représente 7% et le sérotype O78 représente 10% des isolats.

En Algérie, en 2010, dans l'étude d'AGGAD et al ; à Tiaret [102], le sérotypage a révélé que 15 % des isolats appartiennent au sérotype O1, 16% sont de sérotype O2, 21% sont de sérotype O78 et 48% sont non typables ; alors que HAMMOUDI et al [103] en 2006, ont trouvé dans une étude similaire dans la même région, que les sérotypes O78, O2, et O1, représentent respectivement 44%, 29% et 9% ; et 18% des isolats n'appartiennent pas à ces 3 sérotypes

Le sérotypage n'a pas une valeur prédictive absolue : certains *E. coli* non typables sont aussi pathogènes [17]. Les souches n'appartenant pas aux sérotypes O1, O2 et O78, peuvent appartenir à d'autres sérogroupes, aussi importants en pathologie aviaire (O8, O15, O18, O35, O109, O115 et O116) [105]

### L'antibiorésistance :

Les résistances individuelles seront discutées par familles d'antibiotiques

Les taux de résistance sont plus élevés pour les familles les plus anciennes, ceci pourrait s'expliquer par la diffusion des souches résistantes dans les différents environnements et le fait que plusieurs années peuvent être nécessaires pour réduire la fréquence de résistance à un antibiotique, même en absence de pression de sélection.

Les 153 souches n'ont pas présenté de résistance envers la céfotaxime et la nitrofurantoïde car, ces deux molécules ne sont pas utilisées en pathologie aviaire.

- **Tétracyclines :**

Dans nos résultats, l'oxytétracycline étant l'antibiotique qui présente le plus de résistances (94.12%), ceci concorde avec les résultats de HAMMOUDI et al [104], en 2006, AGGAD et al [102] en 2010, et BENAMEUR et al [106] en 2014 dans

l'ouest Algérien qui avaient trouvé, respectivement, des résistances de 82%, de 87%, et 90.4%.

Au Sénégal, Cheikh NDIYAYE et al [107] avaient rapporté une résistance élevée envers l'oxytétracycline (98.15%). En Iran, RAHIMI et al [108], rapportent également un taux élevé de résistance envers l'oxytétracycline (85.1%).

Ceci pourrait être dû à l'utilisation massive de cette molécule, que ce soit à titre prophylactique, curatif, ou comme facteur de croissance.

La résistance des bactéries aux tétracyclines est de nature plasmidique et l'existence d'une grande variété de déterminants génétiques, rend encore plus facile l'acquisition de gènes de résistance par conjugaison ou par transformation. [109]

L'existence, par le passé, d'aliments médicamenteux à base d'oxytétracycline, comme facteur de croissance, sur le marché algérien est aussi incriminée. Pendant plusieurs années les effets positifs de cette pratique étaient mis en lumière. Cependant, les effets néfastes étaient indétectables. Beaucoup de scientifiques se sont penchés sur cette pratique.

Une étude réalisée en 1975 par LEVY et al. [110], pour évaluer l'effet de l'introduction de faibles doses d'oxytétracycline dans l'alimentation des volailles sur la flore intestinale a montré que le nombre de bactéries résistantes était plus élevé chez ceux ayant reçu une alimentation supplémentée en oxytétracycline que chez ceux qui ne l'utilisent pas. Mais aussi que l'augmentation des bactéries résistantes dans la flore intestinale ne concernait pas que les animaux mais aussi l'éleveur et sa famille.

Le taux de résistance à la doxycycline est aussi élevé dans notre étude (75.16%), mais moins élevé par rapport à celui rapporté par l'étude de MESSAI [101] en 2011, dans l'est Algérien, qui était de (98.3%).

La doxycycline, étant un antibiotique récemment introduit sur le marché algérien, et pourtant, sa résistance chevauche avec celle des anciennes molécules, ceci suppose une résistance croisée avec l'oxytétracycline. [111] Ce sont les mêmes protéines qui codent pour la résistance à la tétracycline et la doxycycline [93].

- $\beta$ -lactamines :

Le taux de résistance retrouvé dans notre étude (83.01%) envers l'ampicilline correspond aux résultats obtenus par MESSAI et al [101] (84.5%), ainsi que ceux obtenus au Sénégal par Cheikh NDIYAYE, où le taux de résistance envers l'ampicilline est également élevé (74.08%) [107]

La résistance envers l'association amoxicilline+acide clavulanique dans notre étude est moyenne, elle est de l'ordre de 43.13%, elle est plus faible que celle rapportée par BENAMEUR et al, dans l'ouest Algérien (92.1%)[106] et ABBACHI et al [112] dans le centre de l'Algérie (73.81%)

Divers mécanismes de résistance des *E.coli*, envers les molécules de cette famille sont décrit, l'imperméabilité et l'excrétion de l'antibiotique par efflux sont ceux qui concernent probablement la résistance envers l'amoxicilline+acide clavulanique, car la résistance par production de  $\beta$ -lactamase n'est pas plausible pour cette molécule, elle l'est par contre pour la résistance à l'ampicilline

- Sulfamide-triméthoprimine :

Le taux de résistance envers l'association sulfamide- triméthoprimine dans notre étude (88.89%) correspond à celui retrouvé par MESSAI et al (82.2%) [101], AGGAD et al [102] et BENAMEUR et al [106] avaient également, retrouvés des taux élevés envers l'association sulfamide-triméthoprimine (70% et 70.2% respectivement)

Cette association est très utilisée en pathologie aviaire, notamment pour le traitement non spécifique des coccidioses, et en parallèle contre les colibacilloses, ce qui pourrait expliquer le taux de résistance très élevé.

Par contre, nos résultats sont plus élevés que ceux rapporté dans le bilan 2011 du Résapath en France, par rapport à l'association sulfamide triméthoprimine (près de 30%), ceci pourrait s'expliquer par la différence des protocoles de traitement et la variété d'antibiotiques mis à la disposition du vétérinaire. [113].

- Quinolones et dérivés :

Le taux de résistance aux quinolones est élevé dans notre étude (85.62% pour l'acide nalidixique et 91.5% pour la fluméquine). En Iran, RAHIMI et al [108] ; rapporte un taux également élevé pour ces deux molécules (97.7% pour l'acide nalidixique et 81.8% pour la fluméquine). Les quinolones de troisième génération présentent aussi un taux de résistance élevé, ainsi le taux de résistance à l'enrofloxacin est de 86.27%, il est nettement plus élevé dans notre étude, par rapport à celle de HAMMOUDI et al (6%) [104], et de AGGAD et al (45%) [102].

Cependant nos résultats rejoignent ceux de BENAMEUR et al [106] à l'ouest Algérien, et de RAHIMI et al, [108] en Iran où le taux de résistance à l'enrofloxacin est respectivement de 69.3% et 79.2%.

Les taux élevés de résistance à cette famille d'antibiotiques peuvent être expliqués par la forte utilisation de ces molécules, ainsi qu'à la grande disponibilité d'une large gamme de génériques à des prix très abordables, et dans des conditionnements allant jusqu'au 100ml, permettant l'usage abusif et parfois inadéquat dans la durée.

Les fluoroquinolones sont une nouvelle classe d'antimicrobiens qui présente une excellente activité contre les Gram négatifs, malheureusement leur usage inapproprié dans la filière avicole, a fait augmenter la fréquence de résistance envers ces molécule, pouvant entraîner une résistance croisée avec les fluoroquinolones utilisés chez l'homme [86], considérées comme particulièrement importantes, car elles constituent une des seules alternatives pour le traitement de certaines maladies infectieuses chez l'homme. Selon les recommandations européennes, ces antibiotiques doivent ainsi être réservés au traitement curatif en deuxième intention. [114]

En France, dans le cadre des plans de surveillance à l'abattoir, les données observées pour les années 2007-2008 montrent l'existence d'une proportion importante de souches d'*E.coli* à sensibilité diminuée vis-à-vis des fluoroquinolones pour les productions avicoles.

Cette émergence est très préoccupante du fait de l'importance de cette classe d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire [115].

Selon BAUCHERON et al [87], les mutations au niveau du gène gyr A et gyrB, ainsi que le gène parC, confère la résistance envers tous les membres de la famille des quinolones.

Les taux supérieurs de résistance observés pour les premières générations de quinolones illustrent les mécanismes de résistance à cette famille d'antibiotiques, entre autres, l'accumulation progressive de mutations génétiques dans les gènes chromosomiques concernés, affectant en premier lieu la sensibilité aux quinolones (acide nalidixique, fluméquine), puis celles aux fluoroquinolones (enrofloxacin). [114].

- Chloramphenicol :

Pour le Chloramphénicol, les taux de résistance retrouvés dans notre étude sont relativement élevés (39.22%) et correspondent aux résultats de MESSAI et al (45.6%) [101]. Par contre, le taux obtenu par BENAMEUR et al est moins élevé (10.5%) [106]. Malgré le fait que l'utilisation de cette molécule est interdite en élevage, la résistance d'*E.coli* est élevée ; Ceci peut être dû à la persistance de résistance ancienne ou à l'utilisation illégale de cette molécule.

- Gentamycine :

La Gentamycine a le taux le plus bas de résistance (1.96%), car cette molécule n'est pas utilisée en médecine vétérinaire, le taux retrouvé dans notre étude correspond à celui retrouvé par ABBACHI et al (2.38%) [112]

- Colistine sulfate :

Dans notre étude nous avons trouvé un taux bas de résistance envers la colistine (6.54%), alors que BENAMEUR et al ont trouvé un taux élevé de résistance à la Colistine (31.6%).

La résistance des bactéries à Gram négatif à la colistine n'est pas commune et est même exceptionnelle, elle est de type chromosomique, donc la mutation est rare.

D'autre part, les études effectuées montrent que cette résistance est adaptative ou phénotypique et réversible : elle correspond à une altération de l'architecture de la paroi bactérienne. En outre elle est d'apparition lente. [116].

Les taux de multi résistance sont alarmants (98.7%), et toutes les souches (100%) sont résistantes à au moins 2 antibiotiques. En Algérie, Les travaux de MESSAI et al [101] à l'est en 2011, Abbachi et al [112] en 2013 au centre de l'Algérie, HAMMOUDI et al [104] en 2006 et AGGAD et al [102] en 2010 à l'ouest, ont retrouvés, respectivement que 100, 100, 93, et 72% des souches sont résistantes à au moins 2 antibiotiques

Dans notre étude 98.7% des souches sont résistantes à au moins 3 antibiotiques, 92.81% sont résistantes à 5 antibiotiques, 82.35% sont résistantes à 6 antibiotiques, et 43.13% sont résistantes à 8 antibiotiques.

Nos résultats se rapprochent beaucoup des résultats de MESSAI et al [101] où ils ont retrouvés que 98.9% des souches sont résistantes à 3 antibiotiques, 87.2% sont résistantes à au moins 5 antibiotiques, 83.3% sont résistantes à 6 antibiotiques, et 56.1% sont résistantes à 8 antibiotiques

Les plasmides de résistance aux antibiotiques, expliquent une grande partie des multi-résistances chez *E.coli*. Un nombre très élevé de plasmides codant pour des résistances multiples sont rencontrés chez les entérobactéries, et l'émergence de nouvelles multi-résistances est favorisée par la mobilité des plasmides entre les différentes espèces d'entérobactéries. Les plasmides peuvent être regroupés en familles, dont les principales rencontrées chez des entérobactéries sont: repF, repI1, repN, repHI2, repA/C, repL/M [117]. L'intégron 1 est responsable en partie de la multi-résistance chez les *Escherichia coli* et les autres entérobactéries. [92]

Le taux élevé des multirésistances, suppose l'utilisation abusive des antibiotiques. De nombreux antibiotiques sont administrés de façon concomitante dans le cadre de la prophylaxie ou du traitement, ce qui augmenterait le risque des multi résistances.

La non réalisation des antibiogrammes d'orientations, implique la multiplication de ces pratiques et ainsi au développement des gènes de résistance. Elle conduit aussi au phénomène de co-résistance, engendrant le développement de véritables clones résistants à de nombreux antibiotiques.

Les antibiogrammes retrouvés témoignent de ce phénomène, les antibiotiques les plus utilisés en aviculture forment les antibiogrammes les plus importants dans notre étude, ceci, pourrait être responsable des échecs thérapeutiques lors de colibacillose, mais pas seulement, car en médecine humaine, les problèmes de résistance posent un énorme problème

En effet, les résistances d'*E.coli* en milieu hospitalier en 2011 en Algérie, est de l'ordre de 78.48% envers l'ampicilline et de 52.32% envers sulfaméthoxazole-triméthoprimine[45]

La flore commensale, joue également un rôle clé, comme accepteur et donneur, dans la transmission des mécanismes de résistance. Une étude réalisée par YOLANDA et al. , en Espagne, montre une grande variété de gènes de résistance chez les souches d'*Escherichia coli* multi résistantes et non pathogènes provenant de l'homme, des animaux et des produits de consommation. En plus, l'inclusion de quelques gènes de résistance à des intégrons, constitue un moyen efficace pour la dissémination de l'antibiorésistance. Des changements dans les acides aminés (MarR) et du promoteur (marO) contribuent probablement dans le phénotype de la multirésistance [118]

La bactérie *E.coli*, peut transmettre la résistance d'une part, aux autres espèces par transfert de son matériel génétique, et d'autre part, à l'homme via la chaîne alimentaire ou par contact direct, cette dernière voie de transmission concerne surtout les éleveurs, vétérinaires et le personnel des abattoirs

Certaines études se sont intéressées à ce transfert de la résistance de l'animal à l'homme, une des premières études est celle de LEVY et al en 1976 [64] qui avait étudié le transfert des plasmides provenant de souches résistantes d'*Escherichia coli* à la famille de l'éleveur et ceci après l'introduction de la tétracycline, une autre étude est celle de JOHNSON et al en 2007 [119], il démontre, avec des méthodes épidémiologiques la source aviaire des *Escherichia coli* contaminant des patients dans un hôpital

La forte multirésistance est inquiétante pour l'élevage avicole et pour l'homme, car selon COURVALIN et al [120]; la conséquence de l'organisation génétique lors de co-résistance est la co-sélection : une classe d'antibiotiques à

laquelle la bactérie est résistante pourra sélectionner la résistance à des classes d'antibiotiques non reliées, engendrant ainsi un large phénotype de résistance.

Une étude réalisée aux Pays-Bas par DIERIKS et al en 2012 [121], suppose que l'utilisation élevée des antibiotiques chez le poulet de chair pourrait expliquer (par sélection ou co-sélection) la prévalence élevée du poulet de chair ayant acquis les BLSE, ceci est soutenu par l'étude de PERSOONS et al en 2011 [122], qui avait déterminé que l'usage de l'amoxicilline et de l'enrofloxacin était un facteur de risque, statistiquement significatif, pour le niveau élevé de résistance au ceftiofur chez le poulet de chair.

D'autre part, dans l'étude de DIERIKS et al.[121], la prévalence des BLSE chez le poulet de chair, était également élevée dans les fermes n'utilisant pas d'antibiotiques durant la période de production, ceci indique que d'autres facteurs peuvent influencer l'apparition des BLSE, tel que les mesures de contrôle des infections, ainsi que l'utilisation des antibiotiques chez les reproducteurs

Dans notre étude, les souches BLSE positives sont résistantes également à la tétracycline et doxycycline, ainsi qu'à l'ampicilline et aux quinolones, car souvent, les bactéries qui produisent ces enzymes, capables d'hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines, sont souvent également résistantes à la plus part des familles d'antibiotiques. [123]

En France, grâce à la participation de laboratoires d'analyses au réseau Résapath, les premiers *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3ème et 4ème génération (C 3-4g) isolés d'infections animales ont été mis en évidence en 2004. Ces *E.coli* étaient producteurs d'une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) plasmidique de type CTX-M, déjà connue en médecine humaine.

Les données observées sur 2007-2008, dans le cadre des plans de surveillance à l'abattoir, montrent la présence de souches d'*E.coli* résistantes aux céphalosporines (céfotaxime) en production avicole avec un pourcentage de l'ordre de 3 % confirmant l'émergence mise en évidence en 2004. Cette émergence est très préoccupante du fait de l'importance de cette classe d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. [114]

En Algérie, une étude réalisée par MEGUENNI et al, sur 11 souches d'*E.coli* responsables de lésions de colibacillose aviaires isolées dans différents élevages

de la région Centre Algérien et au cours de différentes années ont permis d'isoler les BLSE du groupe blaCTX-M1 [124]

Certaines enzymes de type céphalosporinases, également codées par des gènes de localisation plasmidique, ont été récemment identifiées chez des souches d'*E.coli* isolées d'infections respiratoires ou de diarrhées du veau nouveau né [125]. De plus, des gènes de résistance à d'autres antibiotiques, tels que le florfenicol, indiqué dans les affections respiratoires bovines et porcines à pasteurelles, étaient également présents sur ces mêmes plasmides, ouvrant l'hypothèse qu'une sélection indirecte (co-sélection) de la résistance aux céphalosporines de troisième génération puisse résulter de l'usage d'autres familles d'antibiotiques.[126] [115].

Aux Pays-Bas, une étude de LEVERSTEIN et al en 2011 [127], démontre que 35% des BLSE produites par les *E.coli* responsables d'infections humaines et 19% des plasmides sur lesquels sont localisés les gènes codant pour ces enzymes sont retrouvés dans la viande de poulet, qui est contaminée à 94% par des *E.coli* producteurs de BLSE entérobactéries résistantes.

Au Canada, d'après les données du réseau CIPARS (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance) le nombre d'*E.coli* résistant au ceftiofur chez le poulet est passé de 16 % en 2003 à 25 % en 2004. [128]

De plus, la présence des gènes de résistance aux céphalosporines de troisième génération sur des éléments génétiques mobiles accroît le potentiel de dissémination de ces gènes intra et inter-espèce bactériennes. [129]. De nombreux arguments attestent de l'absence d'étanchéité absolue entre les divers mondes bactériens (gènes de résistance communs entre l'animal et l'homme).

De ce fait, le transfert de gènes de résistance de bactéries d'origine animale à celles d'origine humaine, et réciproquement, semble biologiquement plausible. A l'heure actuelle, l'évaluation et la quantification de ces flux de gènes entre les populations bactériennes humaines et animales sont peu réalisées. [130]

## CONCLUSION

Les *Escherichia coli* pathogènes aviaires sont responsables de colibacilloses avec des pertes économiques majeures dans nos élevages. Aucun vaccin efficace n'est disponible sur le marché pour l'instant et l'antibiothérapie demeure le seul moyen de lutte contre cette maladie.

Dans nos résultats, les sérotypes O1, O2 et O78 représentent 32% des isolats pathologiques, et les antibiogrammes de cette étude révèlent des taux de résistances alarmants, 98.7% des souches sont résistantes à au moins 3 antibiotiques. Ces phénomènes de multirésistances peuvent conduire à des impasses thérapeutiques.

Les résistances retrouvées et l'émergence des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi constituent un véritable danger rendant les souches qui les portent résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques

Plus que jamais, l'utilisation raisonnée des antibiotiques est un objectif essentiel en termes de santé humaine et de santé animale, il ne suffit pas de réduire quantitativement la consommation d'antibiotiques mais d'en améliorer qualitativement leur utilisation.

## RECOMMANDATIONS

Au vu des différents résultats que nous avons obtenus, il est possible de formuler des recommandations envers le pouvoir public, les professionnels de la santé animale et des aviculteurs, car la problématique de l'antibiorésistance en santé animale concerne tous les acteurs et décideurs des filières de production animale et parce qu'il existe une seule santé (concept « one health »)

### Recommandations en direction du pouvoir public

- Concevoir et diffuser des outils de sensibilisation aux risques liés à l'antibiorésistance et de promotion des bonnes pratiques permettant de prévenir le recours aux antibiotiques à l'intention des éleveurs.
- Mieux prendre en compte le risque lié à l'antibiorésistance dans l'évaluation et la réévaluation du dossier d'AMM, en particulier pour les génériques
- Etablir la liste des antibiotiques « critiques » dont il faut prioritairement préserver l'efficacité pour l'homme
- Réprimer les usages illégaux et les trafics
- Poursuivre le suivi des ventes d'antibiotiques et de l'exposition en rendant obligatoire les déclarations de vente et analyser les données relatives aux aliments médicamenteux
- Renforcer le suivi de l'antibiorésistance, en créant des réseaux de surveillance et assurer la transparence des pratiques d'utilisations des antibiotiques dans le monde animal. A cet égard, l'expérience de l'usage communautaire des antibiotiques en France est intéressante

### Recommandations en direction des vétérinaires :

- Œuvrer pour le respect de la déontologie vétérinaire et les directives des pouvoirs publics en matière d'élevage et de santé animale
- Recourir, aux analyses de laboratoire pour affiner leur diagnostic, et d'orienter leur traitements en fonction des résultats des antibiogrammes

- Sensibiliser et former les aviculteurs sur les risques liés au manque d'hygiène et au danger de l'utilisation incontrôlée des antibiotiques
- Evaluer le bénéfice des traitements alternatifs permettant de limiter le recours aux antibiotiques

#### Recommandations en direction des éleveurs :

Les aviculteurs sont les acteurs principaux de la filière avicole et qui sont en contact direct avec les volailles. Ils ont un rôle fondamental dans la gestion des fermes et l'amélioration de la productivité des cheptels avicoles

- Améliorer leur technicité en matière d'aviculture par des formations
- Favoriser l'application des bonnes pratiques d'élevage (habitat, alimentation, hygiène, biosécurité, gestion des déchets)
- Ne pas utiliser les antibiotiques sans l'avis du vétérinaire (automédication)

#### Recommandations en direction des chercheurs

- Soutenir un programme de recherche fondamentale sur les mécanismes de résistance
- Promouvoir la recherche dans le domaine de l'immunité et de l'utilisation de vaccins ou d'auto-vaccins
- Soutenir la recherche de nouvelles molécules antibiotiques réservées à la médecine vétérinaire et non critiques pour la médecine humaine

**APPENDICE A :**  
Productions avicoles en Algérie

Tableau 1 : Evolution des productions avicoles [131]

Années	Viandes blanches (en tonne)	Œufs de consommation (106 U)
1980	98 000	308
1990	231 000	2800
2000	198 000	2020
2010	296 446	4049

Tableau 2 : Evolution des disponibilités en production aviaire [132] [133]

Années	Viandes blanches (kg/hab./an)	Œufs de consommation (œufs/hab./an)
1980	5.32	21
1990	11.5	120
2000	5.33	49
2010	8.33	114

## APPENDICE B

### Matériel de laboratoire

- Matériel non biologique

Réfrigérateur,  
 Etuve à 35°C,  
 Microscope optique,  
 Bec bunsen,  
 Boîtes de Pétri stériles,  
 Pipettes Pasteur,  
 Tubes à essai,  
 Ecouvillons,  
 Lame et lamelles,  
 Ciseaux,  
 Pincettes métalliques,  
 Anse de platine,  
 Autoclave,  
 Etalon mac Farland 0.5.

- Matériel biologique

*Escherichia coli* ATCC 25922, elle est utilisée pour le contrôle de qualité qui a but d'assurer la précision et la fiabilité des techniques.

- Milieux de culture :

BHIB : bouillon cœur-cerveau.

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait cœur-cerveau.....	17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine.....	10,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Phosphate disodique .....	2,5 g
- Glucose.....	2,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

Gélose nutritive : Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....5,0 g
- Extrait de viande.....3,0 g
- Agar agar bactériologique.....12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2

Gélose Hektoen : Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande..... 12,0 g
- Extrait autolytique de levure..... 3,0 g
- Lactose..... 12,0 g
- Saccharose..... 12,0 g
- Salicine..... 2,0 g
- Sels biliaires..... 9,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Thiosulfate de sodium..... 5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal..... 1,5 g
- Bleu de bromothymol ..... 65 mg
- Fuchsine acide..... 40 mg
- Agar agar bactériologique..... 13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2.

Gélose Muller-Hinton : Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysât acide de caséine.....17,5 g
- Infusion de viande.....2,0 g
- Amidon soluble .....1,5 g
- Agar agar bactériologique.....17,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

- Solutions et réactifs

Eau physiologique stérile,

Réactif de Kovacs,

Réactif TDA,

Réactif VP 1 et VP 2.

- Disques d'antibiotiques

Ampicilline (10 $\mu$ g),

Amoxicilline+acide clavulanique (20/10 $\mu$ g)

Colistine sulfate (10 $\mu$ g)

Tétracycline (30 $\mu$ g)

Acide nalidixique (30 $\mu$ g)

Enrofloxacin (5 $\mu$ g)

Fluméquine (30 $\mu$ g)

Gentamycine (10 $\mu$ g)

Chloramphenicol (30 $\mu$ g)

Sulfaméthoxazole+triméthoprime (1.25/23.75 $\mu$ g)

Doxycycline,

Nitrofurantoin (300 $\mu$ g)

Céfotaxime (30 $\mu$ g)

## APPENDICE C

### Sérums co-agglutinés



**Veillez effectuer votre commande  
LE JEUDI AVANT 12 H  
pour une expédition le MERCREDI SUIVANT  
(fabrication sur commande) MERCI**



## Réactifs coagglutinés : mode d'emploi

Les souches bactériennes doivent être cultivées à 37°C pendant une nuit sur milieu non sélectif, en général gélose tryptocaséine soja sauf : *E. coli* F6 (987P) sur gélose au sang, *E. coli* F41, F17 (FY), F5 (K99) et CS31A sur gélose MINCA, *E. coli* F18 sur gélose ISO Sensitest.

<b>Réactifs coagglutinés</b>	
<b>Conditions de conservation des réactifs</b>	<b>Les réactifs doivent être conservés impérativement à +4°C jusqu'à leur date de péremption indiquée sur chaque flacon compte-goutte. Ils ne doivent pas être congelés (Azoture de sodium : 0,5 %).</b>
<b>Présentation des souches à tester</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> : A partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri pour le mélange. A partir d'une suspension dense (DO à 580 nm comprise entre 1,4 et 1,8) et fraîche (- de 12 h) pour les réactifs individuels. Dans le cas d'éventuelles réactions croisées, diluer la suspension bactérienne au demi puis au quart et considérer que le sérotype de la souche est celui pour lequel la réaction d'agglutination apparaît <b>en premier</b>.</li> <li>• <i>Escherichia coli</i> : A partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri. Dans le cas d'éventuelles réactions croisées, effectuer le test à partir d'une suspension dense (DO à 580 nm comprise entre 1,4 et 1,8 ou EMF = 3) et tester les suspensions diluées au demi puis au quart.</li> <li>• <i>Streptococcus</i> : A partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri. Dans le cas d'éventuelles réactions croisées, effectuer le test à partir d'une suspension dense (DO à 580 nm comprise entre 1,4 et 1,8 ou EMF = 3) et tester les suspensions diluées au demi puis au quart.</li> <li>• <i>Autres</i> : A partir de colonies fraîches sur boîtes de Pétri.</li> </ul>
<b>Réalisation Témoins</b>	<p><b>Après agitation énergique du réactif</b>, mettre en contact, sur une lame, une goutte de réactif avec 3-4 colonies de la souche à tester ou une goutte de réactif avec 30 µl d'eau de suspension dense de la souche à tester.</p> <p>Réaliser deux témoins :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• contrôle réactif : 30 µl d'eau physiologique + une goutte de réactif à chaque utilisation du réactif,</li> <li>• contrôle souche : 30 µl d'eau physiologique + 2-3 colonies si la souche est sur milieu solide ou 30 µl d'eau physiologique + 30 µl de suspension si la souche est en milieu liquide.</li> </ul>
<b>Lecture Interprétation des résultats</b>	<p>Apparition d'agglutinats en 30 secondes d'agitation si le test est réalisé avec des colonies et en 2 minutes si le test est réalisé avec des suspensions. Si le test est réalisé avec des suspensions diluées, le délai d'apparition des agglutinats peut être plus long. <i>L'évaluation qualitative de l'agglutination est de 1 à 3+.</i> Une réaction est considérée positive à partir de 2+.</p> <p>Le sérotype de la souche testée est celui pour lequel des agglutinats apparaissent. En cas de réactions croisées, le sérotype de la souche correspond à celui pour lequel les agglutinats apparaissent en premier.</p>

En cas de résultats douteux ou négatifs, nous pouvons les confirmer par agglutination lente (AGL), avec les souches et les sérums de référence.

## APPENDICE D

Table de lecture 1: valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries (espèce aviaire) [134]

Milieu : Gélose Mueller-Hinton

Contrôle de qualité : *Escherichia coli* ATCC 25922

Inoculum : Colonies en suspension, 0.5 Mc Farland

Incubation : 35°C atmosphère ordinaire : 18h

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b>B-lactamines</b>						
Ampicilline	10 µg	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8
Amoxicilline	10 µg	≤14	.....	≥21	≥32	≤8
Amoxicilline + ac.clavulanique	20/10 µg	≤13	14-17	≥18	≥ 32/16	≤8/4
Ceftiofur	30 µg	≤17	18-20	≥21	≥ 8	≤ 2
<b>Aminosides</b>						
Néomycine	30 µg	≤13	14-17	≥18	≥ 64	≤16
Gentamicine	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥16	≤4
<b>Sulfamides</b>						
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg	≤10	11-15	≥16	≥4/76	≤2/38
<b>Tétracyclines</b>						
Tétracycline	30 µg	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
<b>Quinolones</b>						
Acide nalidixique	30 µg	≤13	14-18	≥ 19	≥ 32	≤8
Fluréquine	30 µg	<21	.....	≥25	≥ 8	≤4
Norfloxacine	10 µg	≤ 12	13-16	≥17	≥16	≤4
Énofloxacine		≤16	17-22	≥23		≤0,25
<b>Polypeptides</b>						
Colistine	10 µg	.....	.....	≥15	.....	.....
<b>Furanes</b>						
Nitrofurantoïne	300 µg	≤14	15-16	≥17	≥ 128	≤32
<b>Phénicolés</b>						
Chloramphénicol	30µg	≤12	13-17	≥18	≥32	≤ 8

Tableau 2 : Concentrations, diamètres et règles de lecture interprétative en médecine vétérinaire pour Enterobacteriaceae [135]

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Streptomycine	10 UI	≤ 8	> 16	≥ 15	< 13	
Apramycine	15 µg	≤ 16	> 16	≥ 15	< 12	
Acide nalidixique	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 15	L'acide nalidixique est le meilleur marqueur des premiers niveaux de résistance aux quinolones. Cet antibiotique ne doit pas être rendu pour les animaux de production, mais peut être utilisé sur l'antibiogramme. Dans ce cas, le résultat de l'acide nalidixique peut être extrapolé à l'acide oxolinique et à la fluméquine. Par contre, l'acide nalidixique peut être rendu pour les carnivores.
Acide oxolinique	10 µg	≤ 2	>4	≥ 20	< 17	Interprétation valable pour la fluméquine
Fluméquine	30 µg	≤ 4	>8	≥ 25	<21	Interprétation valable pour l'acide oxolinique
Enrofloxacin	5 µg	≤ 0,5	> 2	≥ 22	< 17	La résistance aux fluoroquinolones est croisée entre les différentes molécules mais son niveau d'expression peut varier pour chaque molécule
Marbofloxacin	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 18	< 15	
Danofloxacin	5 µg	-	-	≥ 22	< 18	
Difloxacin	10 µg			≥ 26	< 20	Le dépistage des entérobactéries de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones est réalisé par la mesure de la sensibilité à l'acide nalidixique, à l'acide oxolinique ou à la fluméquine. Si le diamètre autour du disque d'acide nalidixique (30 µg) est inférieur à 15 mm ou si la CMI est supérieure à 16 mg/L, il existe un risque élevé de sélection in vivo de mutants résistants aux fluoroquinolones.
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 22	< 19	Interdit chez les animaux producteurs de denrée alimentaire.
Tétracycline	30 UI	≤ 4	>8	≥ 19	< 17	Valable pour oxytétracycline et chlortétracycline.
Doxycycline	30 UI	≤ 4	>8	≥ 19	< 17	
Colistine	50 µg	≤ 2	>2	≥ 18	< 15	Pour un diamètre situé entre 15 et 18 mm, la mesure de la CMI est requise.
Sulfamides	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12	Interprétation valable pour les souches d'origine urinaire.
Triméthoprime	5 µg	≤ 4	>8	≥ 16	< 12	Interprétation valable pour les souches d'origine urinaire.
Triméthoprime/Sulfaméthoxazole	1,25 /23,75 µg	≤ 2/38	> 8/152	≥ 16	< 10	Interprétation valable pour les autres associations triméthoprime-sulfamide.

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Amoxicilline	25 µg	≤4	> 16	≥21	< 14	
Amoxicilline/ac. clavulanique	20 /10µg	≤ 4/2	> 16/8	≥21	< 14	
Céfalexine	30 µg	≤8	> 32	≥ 18	< 12	Si céfalexine < 12 mm : recherche de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et de d'hyperproduction de céphalosporinase. BLSE : Amoxicilline-R, Amox+clav.-S-I-R, Céfalexine-R, Céfoxitine-S, Ceftiofur-(S)-I-R, Cefquinome-(S)-I-R Observation d'une synergie en «bouchon de Champagne» entre le disque d'amoxicilline + ac. clavulanique et le disque de ceftiofur ou d'une autre C3G/C4G. Hyperproduction de céphalosporinase : Amoxicilline-R, Amox+clav.-R, Céfalexine-R, Céfoxitine-R, Ceftiofur-I-R, Cefquinome-S-1 Pas de synergie en «bouchon de Champagne». Cf. règles (1), (2) et (3) Note : la parenthèse indique que la catégorisation S peut exister en cas de BLSE mais qu'elle est très rare.
Ceftiofur	30 µg	≤2	>4	≥ 21	< 18	
Céfovécine	30 µg .	≤2	>4	≥ 21	< 18	
Céfopérazone	30 µg	≤4	> 32	≥ 21	< 14	En cas de résultat I, un traitement par la céfopérazone reste possible avec une spécialité à usage local
Cefquinome	30 µg	≤2	> 4	≥ 22	< 19	Voir ci-dessus (remarques ceftiofur) pour les caractéristiques des BLSE et des céphalosporinases haut niveau
Céfoxitine	30 µg	≤8	> 32	≥ 22	< 15	Cette molécule n'est pas disponible en médecine vétérinaire et n'est donc pas concernée par la règle (1). Son utilisation dans les antibiogrammes permet d'affiner la détection des souches possédant une BLSE ou une céphalosporinase de haut niveau.
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤2	> 4	≥ 18	< 16	
Kanamycine	30 UI	≤8	> 16	≥ 17	< 15	
Néomycine	30 UI	≤8	> 16	≥ 17	< 15	

**APPENDICE E**  
**LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
APEC :	Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i>
ARN :	Acide ribonucléique
BLSE :	$\beta$ -lactamase à Spectre Elargi
CCI :	Concentration Critique Inférieure
CCS :	Concentration Critique Supérieure
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
<i>E.coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ExPEC :	Extra-Intestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i>
I $\beta$ L :	Inhibiteur des $\beta$ -lactamases
LDC :	Lysine Décarboxylase
LEE :	Locus d'effacement de l'entérocyte
Min :	Minutes
MLS :	Macrolide-Lincosamide-Streptogramine
ODC :	Ornithine Décarboxylase
Omp :	Outer Membrane Protéin
ONPG :	Orthonitrophényl- $\beta$ -Galactoside
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PLP :	Protéine liant les pénicillines
Résapath :	Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SHU :	Syndrome Hémorragique Urémique
TDA :	Tryptophane désaminase
UPEC :	Urogenic Pathogenic <i>Escherichia coli</i>
VP :	Voges-Proskauer

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mahmoud, Chaal., “ Nouveau cap fixé par Rachid Benaïssa, production de 1,1 million de tonnes de viandes blanches par an” de l'éconews, 25 avril 2013.
2. Ministère de l'agriculture et du développement rural. “Avant projet d'une charte de qualité et pacte de croissance encadrant et engageant les activités des professionnels de la filière avicole pour la structuration et la modernisation de l'aviculture nationale”, aout 2012.
3. STORDEUR, P., MAINIL, J., “La colibacillose aviaire”, Ann. Méd. Vet.146 (2002), p : 11-18.
4. Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., “Bactériologie clinique” édition ellipses, 3ème édition, p : 175-182.
5. Grimont, P., “Taxonomie des Escherichia”, Med. Mal. Infect. (Numéro spécial), (1987), p : 6-10.
6. Bergey's, manual of systematic bacteriology,. second edition, volume two ; The Proteobacteria part B, Gammaproteobacteriaceae, 587-623.
7. Le Minor, L., Sansonetti, Cl. Richard., Grimont, F., Mollaret, H.H., Bercovier, H., Alonso, J.M., “ Entérobactéries” in Le Minor., Michel Veron., “Bactériologie médicale”, (1989), 389-406
8. James B., Karper, James, P., Nataro, “Pathogenic *Escherichia coli*” nature reviews of microbiology, volume 2, (February 2004) p: 123-140.
9. Fritz, H., Kayser, Erik., C.Bottger, Zinkernagel, Rolf. M., “Manuel de poche, microbiologie médicale”, édition Flammarion, 11ème édition, 306-309.

10. Nauciel, C., "Bactériologie médicale", (2000), p: 51-74 et 125-131 édition Masson.
11. Fraser, M. E., Fujinaga, M. M., Cherney, A. R. Melton-Celsa., E. M. Twiddy, A. D. O'Brien, and M. N. James., "Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7", J. Biol. Chem. (2004).279:27511-27517.
12. Ismaili, A., Philpott, D.J., Dytoc, M.T., and Sherman, P.M., "Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*", Infect. Immun., 63: (1996), 3316-3326.
13. Cookson, S.T., Nataro, J.P., "Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*", Microb. Pathol., 21(1996), p: 421-434.
14. Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, and L. K. Nolan., "Characterizing the APEC pathotype", Vet. Res. 36(2005) 241-256.
15. Johnson, T. J., L. K. Nolan. "Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*", Microbiol, Mol, Biol, Rev, 73(2009)750-774.
16. Brice Robineau et Pierre Yves Moalic, "Une maladie d'actualité en production aviaire: la colibacillose", communication présentée le 11 Mars 2010.
17. Guerin, Jean-Luc., et Cyril Boissieu., "Les colibacilloses ou infections à *Escherichia coli*", Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 30/06/2008.
18. Dho-Moulin., M. Fairbrother., J.M., "Avian pathogenic *Escherichia coli*" veterinary research(1999), 299-316.
19. Brugere Picoux, Jeanne., et Amer, Silim., "Manuel de pathologie aviaire", (1992), p: 237-239.
20. Villate, Didier., "Maladies des volailles", 2ème édition, édition France agricole, p : 236-243.

21. Arp, L.H., and A.E. Jensen., "Piliation, hemagglutination, motility, and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent of turkeys", Avian. Dis. 24:(1980), 153-161.
22. Wooley, R. E., P. S. Gibbs., T. P. Brown., J. R. Glisson., W. L. Steffens., and J. J. Maurer., "Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11", Avian. Dis. 42: (1998), 194-198.
23. Nakazato, G., T. Amabile de Campos., E. Guedes Stehling., M. Brocchi., and W. Dias da Silveira., "Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) ", Pesq. Vet. Bras. 29, (2009), 479-486.
24. Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, "Extra intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns" J. Clin. Microbiol. (oct. 2007) 3366-33760
25. Marc, D., Arne, P., Bree, A., Dho-Moulin M., "Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*", Res. Microbiol., 149(1998), 473-485.
26. Arne, P., Marc, D., Bree, A., Schouler, C., Dho-Moulin M., "Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion", Avian Dis, 44(2000), 43-55.
27. Vandemaele, F., Ververken, C., Bleyen, N., Geys, J., D'hulst, C., Addwebi, T., Van, Empel, P., Goddeeris Bm., "Immunization with the binding domain of FimH, the adhesin of type 1 fimbriae, does not protect chickens against avian pathogenic *Escherichia coli*", Avian Pathol, 34(3)(2005), 264-272.

28. Achtman, M., A. Mercer., B. Kusecek., A. Pohl., M. Heuzenroeder., W. Aaronson., A. Sutton, and R. P. Silver., "Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates", *Infect. Immun.*, (1983) ,39: 315-335.
29. Dozois, C. M., J. M. Fairbrother., J. Harel, and M. Bosse., "pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys", *Infect Immun* 60, (1992), 2648-2656.
30. Bouguenec, C., M. Archambaud., and A. Labigne., "Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction", *J. Clin. Microbiol.* 30, (1992),1189-1193.
31. Olsen, A., Jonsson, A., Normark, S., "Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli* ", *Nature* 338(1989), 652-655.
32. Maurer, J. J., Brown, T. P., Steffens, W. L., and S. G. Thayer., "The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*", *Avian. Dis.* 42: (1998) 106-118.
33. Mellata, M., Ameiss, K., H. Mo, and Curtiss, R., "Characterization of the Contribution to Virulence of Three Large Plasmids of Avian Pathogenic *Escherichia coli*  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9) ", *Infect. Immun.* 78, (2010), 1528-1541.
34. Stordeur, P., Beaupain, N., Mainil., "Caractérisation génotypique des souches invasives aviaires d'*Escherichia coli* isolées en Belgique ", *J. Ann Med. Vet.* (2003).147, 275-280.

35. Mellata, M., Dho-Moulin, M., Fairbrother "Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity" *Infect. Immun.* 71(2003), 536-540.
36. Howard, C. J., and A. A. Glynn., "The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement", *Immunology* 20(1971), 767-777.
37. Gross W.B., "Colibacillosis", In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M. & Yoder J.H.W., (Eds), *Disease of Poultry*, 9th ed, Iowa State University Press, Ames, (1991) 138-144.
38. Dziva, Francis., Mark, P.Stevens., "Colibacillosis in poultry : unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts", *division of microbiology, Berkshire*, (14 Jul2008),37(4), 355-366.
39. Carbonetti, N. H., and P. H. Williams., "A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30", *Infect. Immun.*46, (1984), 7-12.
40. Wooley, R.E., Gibbs, P.S., Brown T.P., Maurer J.J., "chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates", *Avian Dis*, 44, (2000), 318-324.
41. Provence, D. L., and R. Curtiss., "Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain", *Infect. Immun.* 62(1994)1369- 1380
42. Dozois, C.M., Dho-Moulin M., Bree A., Fairbrother J.M., Desautels, C., Curtis R., "relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region", *Infect. Immun.* (2000), 68, 4145-4154.

43. Lutful Kabir, S. M., "Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns", *Int. J. Environ. Res. Public Health* v.7(1) (2010). 89-114
44. Bélanger, Louise., Amélie, Garénaux., Sébastien, Houle., "Développement d'un vaccin atténué contre les colibacilloses aviaires" ministère de l'agriculture, pêcheries et de l'alimentation, Canada, (2012).
45. Rahal, K., Aggoune, N., Assaous, F., Benamrouche, N., Benslimani, "les antibiotiques", office des publications universitaires.
46. Ramdani, N., Seghier, M., Belouni, R., Benslimani, A., "Manuel de microbiologie à l'usage des étudiants en 3ème année de Médecine", Coordonné Par F. Boulahbal., Office des publications universitaires. 91-126.
47. Fauchere, Jean-Louis., Avril, Jean-Louis., "Bactériologie générale et médicale", édition ellipses, 140-160 et 237-240.
48. Villemin P., Brugere, H., et Brugere-Picoux, J., "Le traitement des infections respiratoires des volailles", *Recueil de la Médecine Vétérinaire*, 160 (1984)(11), 1117-1128.
49. Fontaine, M., "vade-mecum du vétérinaire", 15ème édition, volume 1.
50. Bensemmane, A., Tber, A., Zarrouk, K., "Dictionnaire des médicaments vétérinaires au maghreb", 1ère édition, 1992.
51. Courvalin, P., Philippon, A., "Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens", in *Bactériologie médicale*, Le minor L., et Véron Michel (1989) ; 332-355.
52. Françoise, Van, Bambeke., Paul, Tulkens., coord, Prof, A. Herchuelz., "Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse", *Syllabus national belge de pharmacologie*, (2007-2008).

53. DUVAL, J., "Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens ", In : Le Minor L., Veron M., Bactériologie médicale, 2e ed, Paris, Flammarion, (1989) : 273-296.
54. Brion, J. D., Loppinet, V ., Plat, M., Afect, "Traité de chimie thérapeutique", Volume 2 : Médicaments antibiotiques, in. Paris : Tec e Doc Lavoisier (1992).
55. Yala, D., Merad A.S., Mohamedi, D., et Ouar, Korich, M.N., "Classification et mode d'action des antibiotiques ", Médecine du Maghreb, n°91, (2001).
56. Ian, Chopra., and Marilyn, Roberts., "Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance", microbiol, Mol, Biol, Rev, (Jun 2001) 65(2): 232-260.
57. P.L. TOUTAIN., "Les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire ", Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, (fév. 2012)
58. National Commitee For Clinical Laboratory Standards., "performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals ", second edition. (2002).
59. Bywater, R. J. "Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production ", Poult. Sci. 84(2005), 644-648.
60. La note d'analyse n°299, "les bactéries résistantes aux antibiotiques", (novembre 2012).
61. Millemann, Y., Heskia, B., Belbis, G., " Stratégie thérapeutique et impact sur la résistance ", Bulletin des GTV, (2012).19–28.
62. Moritz, van, Vuuren., "Résistance aux antibiotiques, notamment en aviculture ", Conf, OIE (2001).

63. Bogaard, Anthony E., van den ., “Epidemiology of resistance to antibiotics, Links between animals and humans”, international journal of antimicrobial agents, 14(2000), 327-335
64. Levy, S.B., Fitzgerald, G.B, Macone, A.B., “changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm”, Eng. Journ. Med. (1976), 583-588.
65. Bogaard, Anthony, E., van, den., “Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers”, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, (2001), 763-771.
66. Marshall, Bonnie, M., Stuart, B., Levy, “Food animals and antimicrobials : impacts on human health”, Clin. Microbiol.Rev. (2011)718-733
67. The American Academy of Microbiology, “Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem”.
68. Ferron, A., “La résistance des bactéries aux antibiotiques”, Bactériologie médicale, Chapitre 76, 15th ed., Ed. C., et R., Paris, (1994),12 pages.
69. Afssa, 2006, Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine.
70. D’COSTA, V. M., KING, C. E., et al, “Antibiotic resistance is ancient”, Nature, (2011) 457–461.
71. KAYSER, F., Zürich, P.O “Evolution of resistance in microorganisms of human origin”, Vet. Microbiol. (1993) 257–267.
72. Carattoli., “Importance of integrons in the diffusion of resistance”, Veterinary research, 32(2001), 243-259.

73. Dutta, C., and A. Pan., "Horizontal gene transfer and bacterial diversity", J. Bio.sci., (2002)27:27-33
74. Thomas, C. M., and K. M. Nielsen., "Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria", Nat. Rev. Microbiol. 3 (9)(2005), 711-721.
75. Bacon, R.T., Sofos, J.N, Kendall, P.A, Belk, K.E., Smith G.C., "comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial resistant salmonella strains cultured under stationary-phase acid tolerance inducing and non-inducing conditions", Journal of food protection (2003) 732-740.
76. Levy, S.B., "the challenge of antibiotic resistance", Scientific American, 278 (1998), 32-39.
77. Cattoir, Vincent., "Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ".  
Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Mondor, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris XII
78. Lavigne, J. P., Sotto, A., Merle, C., Jourdan, J., Soussy, C-J. et Sirot, D., "Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux  $\beta$ -lactamines et prévalence en clinique", Pathol. Biol., 50: (2002) 388-393.
79. Tulkens, P. et Spinewine, A., Université catholique de Louvain, "Pharmacologie spéciale: les  $\beta$ -lactames, Pharmacologie et pharmacothérapie des anti- infectieux", (2002).
80. Wladimir, sougakoff., et David, Trystram., faculté de médecine Pierre et Marie Curie. Chapitre 7, "Résistance aux  $\beta$ -lactamines"
81. Collignon, A, Beljean-Leymarie, M., Farinotti, R., et Doutremepuich C. Infectiologie, Vol3, Collection Le Moniteur des Pharmacies, (2007) 354-355.

82. Rodriguez-Villalobos, H., et Struelens, M.-J., "Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu", *Réanimation*; 15: (2006) 205-213.
83. Paterson, D. L., Pittsburgh, Pennsylvania, "Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae", Vol34 n°5. (2006).
84. Ruppé, E., "Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M", Elsevier. 6-12
85. Li X-Z., Mehrotra M., Ghimire S., et Adewoye L., " $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin", *Veterinary Microbiology*, 121(2007) 197-214.
86. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A et J. Blanco., "Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chicken in Spain", *J.Clin.Microbiol* (1997), 2184-2185.
87. Baucheron, S., Mouline, C., Payot, S., Cloekaert, A., Chaslus-Dancla, E., "Mécanismes de résistance aux quinolones des *Escherichia coli* aviaires " INRA, Cinquièmes journées de la recherche avicole, Tours, (26 et 27 mars 2003).
88. Bonnet, R., "growing group of extended spectrum  $\beta$ -lactamases : the CTX-M enzymes" *antimicrob. agents chemother.* 48(1) (Jan 2004), 1-14.
89. Huovinen, P., Sundstrom, L., "trimethoprim and sulfonamid resistance " *antimicrob. agents. chemother.* 39(2) (Feb 1995), 279-289.
90. Zhang, T., Wang, C.G., and Zhong, X.H., "Survey on sulfonamide antibiotic-resistant genotype and phenotype of avian *Escherichia coli* in North China", *poultry science*, (2012), 884-887.

91. Wang, C.G., J.C. Lv., T. Zhang., “detection of resistance phenotype and genotype of avian *Escherichia coli* in Hebei province”, Poultry science 92(9), (2013) ,2326-2332.
92. Gyles, C. L., “Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry”, Anim. Health Res. Rev 9, (2008) ,149-158.
93. Taylor Dodgen, “*Escherichia coli* and Antibiotic Resistance to Tetracycline Antibiotics”, (2008) senior honor thesis
94. Ministère de L'intérieur et des Collectivités Locales.
95. Andi, agence nationale du développement de l'investissement, wilaya d'Ain Defla (2013).
96. MADANI, Azzeddine., correspondant de “la Tribune ”, à Ain Defla. La filière avicole tente de se reconstruire à Aïn Defla. Après une longue période de difficultés, publié le 10/03/2013
97. SAC , Société des Abattoirs du Centre.
98. Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale, selon les recommandations de l'OMS, édition 2005.
99. 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.
100. Giovanardi, D., E. Campagnari., “Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain”, Avian Pathology,( Jan 2007), 313-318.

101. Messai, C., Khelef, D., Bokhors, KT., “Antibiorésistance de souches *E.coli* isolées de poulets de chair atteints de colibacillose, à l’abattoir avicole de Sétif”. Filière avicole, ISSN (2011), 2170-0125
102. Aggad, H., Y. Ahmed Ammar, Hammoudi., “Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis”, Global Veterinaria 4, (2010)
103. Sojka,W.J, Carnaghan, R. B. A., “ *Escherichia coli* infection in poultry” Res. Vet. Sci 2 ; (1961), 340-352
104. Hammoudi, A., Aggad, H., “Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from chicken colibacillosis in Western Algeria”,Turk. J. Vet. Anim. Sci. (2006)
105. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, “serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain)”, Vet. Microbiol. 61 (1998) ;229-235
106. Benameur, Q., Guemourb, D., A. Hammoudi., “Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens in West of Algeria” IJSBAR,(2014).
107. Cheikh, Ndiaye., “ Etude anatomo-clinique et bactériologique sur des cas suspects de colibacillose aviaire dans les régions de Dakar et Thies (Senegal)”, (2010).
108. RAHIMI, M., “Antibioresistance Profile of Avian pathogenic *Escherichia coli* Isolates Recovered from Broiler Chicken Farms with Colibacillosis in Kermanshah Province, Iran”, global veterinaria 10 (4) (2013): 447-452.
109. Tricia, D, Miles., Wayne, McLaughlin., and Paul. D.Brown., “Antimicrobial resistance *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans”, BMC Veterinary Research, (2006) 2:7.

110. Levy, S.B., Fitz, Gerald, G.B., Macone, A.B., “Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm”, *Engl. Jour. Med.* (11): (1976), 583-588.
111. John, G., Bartle, Larry, A., Bustetter, Sherwood, L., Gorbach, “Comparative Effect of Tetracycline and Doxycycline on the Occurrence of Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Flora”, *Antimicrob. Agents. Chemother. J.* vol, 7.(1975)55-57
112. Abbachi, Abdennour., “prévalence et profils d’antibiorésistances des souches *E.coli* isolées des poussins chair et œufs embryonnés au couvoir de monsieur Bakhellal à taourga ”, thèse de magister ENSV d’Alger, (2014).
113. RESAPATH Réseau d’épidémiosurveillance de l’antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, Bilan 2011.
114. Anses, journée sur l’antibiorésistance en santé animale, 18 novembre 2010.
115. Bulletin épidémiologique, n° 36, “Apport du Résaparth à la problématique de l’antibiorésistance en santé animale : analyse des données recueillies en 2008 sur *Escherichia coli* dans les différentes filières animales”.
116. MAURE, D., “Etude pharmacologique et toxicologique de la colistine. Applications aux maladies néonatales du veau”, Université Claude Bernard, Lyon, (1986).
117. Carattoli, A., “Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae”, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53:(2009) 2227-2238.
118. Yolanda. Saenz., Laura, Brinas., Elena, Domínguez., “Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (Oct. 2004), 3996–4001.

119. Johnson, J.R., "antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, 2002-2004", *Emerg. Infect. Dis.* 13, (2007), 838-846.
120. Courvalin, P., "la résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques", *Bull. Acad. Vet. France*. Tome 161 n°1.
121. Cindy, Dierikx, Jeanet van der Goot "Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers ", *J. Antimicrob. Chemother.* 10.1093.349 (2012).
122. Persoons, D., Haesebrouck, F, Smet, A., " Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers ", *Epidemiol Infect*, 139(2011) 765–771.
123. Berthod, D., Pouget, R., "Entérobactéries résistantes, explosion des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi", *Rev. Med. Suisse*, (2012).
124. Meguenni, Nacima., Laetitia, Le Devendec., "Caractérisation moléculaire de souches d'*E. coli* aviaires productrices de BLSE, isolées de la région Centre d'Algérie", université Mouloud Maameri, Tizi Ouzou.
125. Meunier D., Jouy, E., Lazizzera C., Doublet, B., Kobisch, M., Cloeckaert A., Madec J.-Y "Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the *floR* and *bla*CMY-2 genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France ", *Journal of Medical Microbiology* , 59 (2010). 467-471
126. Botrel, M, A., Morignat, E., Meunier, D., Madec J.-Y., Calavas, D., "Identifying antimicrobial multiresistance patterns of *Escherichia coli* sampled from diarrhoeic calves by cluster analysis techniques :a way to guide research on multiresistance mechanisms ", *Zoonoses and Public Health*, 1-7. (2009).
127. Leverstein-van, Hall, MA., Dierikx, CM., Cohen Stuart J., "Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains", *Clin. Microbiol. Infect.* 17: (2011);873-80.

128. Li, X.-Z., M. Mehrotra, S. Ghimire, and L. Adewoye., "beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin", *Vet. Microbiol.*, 121(2007)197-214.
129. Thomson, K., S. Moland, E.S., "the new  $\beta$ -lactamases of Gram negative bacteria at the dawn of the millenium", *microbes and infection*, 2, (2000)1225-1253.
130. Faure, Stéphanie., Agnes, Perrin-Guyomard., "impact of therapeutic treatment with  $\beta$ -lactam on transfert of the blactx-m9 resistance gene from *Salmonella Enterica* Serovar *Virchow* to *Escherichia coli* in gnotobiotic rats" *Applied and Environnemental Microbiology*, (2009), 5523-5528.
131. ONS, Office National des Statistiques.
132. MADR, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.
133. ITELV, Institut Technique De L'élevage.
134. Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, 6ème édition, document édité en collaboration de l'OMS.
135. Groupe de travail, antibiogramme vétérinaire du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandations 2014.