

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR



ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

MEMOIRE

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

Option : Pathologie Infectieuse et Hygiène Alimentaire

THEME

**ANTIBIORESISTANCE DES ENTEROBACTERIES
D'ORIGINE AVIAIRE**

Présenté par :

Dr : BENAMEUR Qada

ANNEE 2010-2011

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR



ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

MEMOIRE

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

Option : Pathologie Infectieuse et Hygiène Alimentaire

THEME

ANTIBIORESISTANCE DES ENTEROBACTERIES D'ORIGINE AVIAIRE

Présenté par : **Dr : BENAMEUR Qada**

Jury :

Président : AMARA Karim, Maitre de conférences « A », Université Ibn Khaldoun de TIARET.

Examinatrices :

OUABED Asmahan, Maitre de conférences « B », Université Ibn Khaldoun de TIARET

MIHOUB Fatma, Maitre de conférences « B », Université Ibn Khaldoun de TIARET.

Rapporteur :

HAMMOUDI Abdelhamid, Maitre de conférences « A », Université Ibn Khaldoun de TIARET.

Co-rapporteur :

AGGAD Hebib, Maitre de conférences « A », Université Ibn Khaldoun de TIARET.

ANNEE 2010-2011

RESUME

La colibacillose est sans doute l'infection bactérienne la plus fréquente et la plus importante en pathologie aviaire. Elle peut entraîner mortalité et/ou baisse des performances ou tout simplement, des consommations importantes en produits vétérinaires.

En vue d'estimer l'ampleur de l'antibiorésistance des entérobactéries d'origine aviaire au niveau de Mostaganem, Mascara, Tiaret, Relizane, Chlef et Tissemsilt, nous avons isolés 240 souches d'entérobactéries parmi lesquelles prédominaient *E. coli* suivie de *proteus spp* et *d'enterobacter spp*.

L'évaluation de la résistance des *E. coli* vis-à-vis de treize antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose selon les normes de NCCLS.

La recherche des gènes *Qnr* a été effectuée par la PCR multiplex sur 18 souches d'entérobactérie qui présentaient une résistance pour la famille des quinolones.

Nos résultats montrent que 95,65% et 94,78% des *E coli* sont résistantes respectivement aux tétracyclines et à l'amoxicilline alors que pour les quinolones, celle-ci était aux alentours de 94,78.

Un taux alarmant de l'antibiorésistance d'*E. coli* vis-à-vis d'un seul antibiotique a été signalé (100%), ainsi que pour la multirésistance (96.51% pour au moins 2 antibiotiques et 92,20% pour au moins 3 antibiotiques).

Les autres espèces d'entérobactéries présentaient aussi des antibiorésistances élevés.

Face à l'augmentation perpétuelle des antibiorésistances en pathologie aviaire, un plan de surveillance doit être instauré et respecté.

Mots clés : *E. coli*, Entérobactéries, Antibiorésistance, aviculture, PCR multiplex.

ملخص

يعد داء الكوليباسيلوز colibacillose من بين أهم و أكثر أمراض الطيور انتشارا. بحيث يمكن أن يسبب وفيات أو نقصان في الإنتاج أو ببساطة استهلاك كبير في منتجات الصحة الحيوانية. من أجل تقدير مدى مقاومة بكتيريا الأمعاء Entérobactéries المعزولة عند الطيور للمضادات الحيوية في مستغانم ، معسكر ، تيارت ، غليزان ، الشلف وتيسمسيلت ، عزلنا 240 سلالة لبكتيريا الأمعاء . النسبة الأكبر سجلت للاشيريشيا كولي *E. coli* ثم *Proteus spp* ثم *Enterobacter spp*. إن تقييم مدى مقاومة *E. coli* لثلاثة عشرة نوع من المضادات الحيوية قد تم بطريقة الانتشار وفقا لمعايير NCCLS. أجري البحث عن جينات qnr باستعمال طريقة PCR multiplex متعددة الجينات لثمانية عشرة سلالة من بكتيريا الأمعاء التي كانت تقاوم عائلة الكينولون quinolones .

95.65 % و 94.78 % *E. coli* منها سجلت مقاومة ضد التتراسيكلين وأموكسيسيلين على التوالي أما بالنسبة للكينولون ، فكانت المقاومة بنسبة حوالي 94,78 %.

لقد بلغ معدل ينذر بالخطر حيث أن نسبة مقاومة مضاد حيوي واحد قد بلغت (100 %)، نفس الشيء بالنسبة للمقاومة المتعددة (99.55 % منها سجلت مقاومة لمضادين حيويين على الأقل و97.05 % لا يقل عن ثلاث مضادات حيوية) الأنواع الأخرى لبكتيريا الأمعاء أظهرت أيضا مقاومة عالية للمضادات الحيوية.

لحد من هذا التزايد في مقاومة المضادات الحيوية عند الطيور، لا بد من وضع و احترام خطة متابعة الكلمات الرئيسية : اشيريشيا كولي *E. coli*، بكتيريا الأمعاء Entérobactéries، مقاومة المضادات الحيوية، تربية الدواجن ، PCR متعدد.

SUMMARY

The Colibacillosis is undoubtedly the most frequent and most significant bacterial infection in avian pathology. It can involve mortality and drop of performance or simply significant consumption in veterinary products.

In order to assess extent of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae of avian origin at Mostaganem, Mascara, Tiaret, Relizane, Chlef and Tissemsilt areas, 240 strains were isolated among which predominated *E. coli* followed by *Proteus spp* and *Enterobacter spp*.

Evaluation of *E. coli* resistance against 13 antibiotics was performed by agar diffusion method according to NCCLS standards.

Investigation for Qnr genes was performed by multiplex PCR for 18 strains of Enterobacteriaceae resistant to quinolones.

95.65% and 94.78% strains were respectively resistant to tetracycline and amoxicillin while for the quinolones, it was around 94.78.

An alarming rate of antibiotic resistance to a single antibiotic has been noticed (100%), as well as multidrug resistance (96.51% for at least two antibiotics and 92.20% for at least three antibiotics).

Other species of enterobacteria also showed high antimicrobial resistance. A monitoring program must be established and respected in order to fight increasing antibiotic resistance in avian pathology.

Keywords: *E. coli*, Enterobacteriaceae, antimicrobial resistance, poultry, multiplex PCR.

INTRODUCTION:

En Algérie, la filière avicole « chair » a connu depuis 1980 un développement notable, soutenu par une politique incitative. Cependant, les pratiques d'élevage accusent un retard technologique considérable par rapport aux pays industrialisés, ceci retentissant non seulement sur la productivité des ateliers avicoles, mais aussi et surtout sur la santé publique. En effet, la problématique de la filière avicole sur le plan sanitaire reste toujours tributaire des conditions d'élevage en général, et plus particulièrement de l'hygiène des bâtiments (Kaci et al, 2001).

La volaille constitue l'un des principaux réservoirs des entérobactéries et se trouve par conséquent souvent incriminée dans de nombreuses toxi-infections alimentaires collectives (Cardinale et al, 2002). Et si, l'association entre salmonelles et viande de poulet s'est très vite installée faisant de la lutte contre le genre *Salmonella* l'une des préoccupations majeures du monde vétérinaire et de l'industrie agroalimentaire, tant du fait de la maladie provoquée chez l'animal, que par leur association très étroite avec les toxi-infections alimentaires chez l'homme (Bouvet, 2002), les *Escherichia coli* (*E. coli*), bactérie de la flore intestinale commensale des animaux, tout en continuant à être l'une des plus importantes causes de pertes économiques dans le secteur avicole, n'ont guère été, un souci de santé public. Seuls certains pathotypes d'*E. coli*, susceptibles d'infecter l'homme, peuvent être véhiculés par les volailles (Guerin et Boissieu, 2006)

Chez les animaux, les agents antimicrobiens sont utilisés pour le traitement des maladies, leur prophylaxie et la croissance; Ils sont parfois utilisés de façon anarchique, sans diagnostic précis, en doses insuffisantes ou en surdosage, constituent une forte pression de sélection dans les élevages intensifs (Ungemach et al, 2006).

Dans la plupart des cas, la résistance aux antibiotiques n'émerge pas directement chez les bactéries pathogènes. Tout au contraire, sa montée en puissance se fait d'abord chez des bactéries non pathogènes, commensales ou environnementales, et ce n'est que dans un deuxième temps que les mécanismes de résistance sont transférés horizontalement chez des bactéries pathogènes. La production et la dissémination de centaines de milliers de tonnes d'antibiotiques, tous usages confondus (médecine humaine et vétérinaire, élevage et agriculture), ont constitué depuis un demi-siècle un stress nouveau auquel le monde bactérien a fait face sans trop de difficulté. Il n'y a probablement pas une bactérie de plus sur terre

Introduction

qu'avant l'utilisation des antibiotiques, mais elles sont plus résistantes. La résistance des bactéries aux antibiotiques est un phénomène désormais « globalisé », touchant l'ensemble des espèces bactériennes d'importance médicale et la totalité des classes d'antibiotiques disponibles. (Drobni, 2009; Bonnedahl, 2009).

La résistance plasmidique aux quinolones est augmentée de façon ascendante chez les entérobactéries d'origine humaine mais elle est très rare chez les souches d'origine animale (Robicsek, 2006).

Il a été récemment découvert un nouveau mécanisme de résistance aux quinolones qui a une transmission plasmidique, ce qui n'était pas connu jusqu'à présent. La première souche a été décrite en 1998, chez *Klebsiella pneumoniae*. Il a été ensuite montré que le plasmide de résistance contenait le gène *qnr* codant pour une protéine (Qnr).

La prévalence des gènes *qnr* dans des isolats d'entérobactéries d'origine humaine est couramment décrite dans le monde (Robicsek et al, 2006). Cependant, quelques études ont montrées la présence des gènes *qnr* dans les isolats d'*E. coli* d'origine animale.

En raison de la quasi absence de données algériennes valides sur le sujet, ce travail a eu par conséquent pour principal objectif l'étude de l'antibiorésistance des entérobactéries d'origine aviaire (chair et ponte) dans six régions ; Mostaganem, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret et Tissemsilt. Notre étude s'est étagée en trois paliers :

1. Déterminer les espèces d'entérobactéries les plus couramment trouvées dans l'espèce aviaire ;
2. Déterminer le profil de résistance des germes isolés ;
3. Recherche des gènes Qnr de résistance plasmidique aux quinolones.

Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries

1. Définition

La famille des Enterobacteriaceae est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs :

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 μm de long et 0,3 à 1 μm de large ;
- Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles ;
- Se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire ;
- Acidifiant le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz ;
- Ne possédant pas d'oxydase ;
- Réduisant les nitrates en nitrites.

2. Classification :

Une centaine d'espèces d'Entérobacteriaceae sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99% des souches isolées en clinique.

Les Entérobactéries qui intéressent la Bactériologie médicale peuvent être regroupées en quatre tribus :

- . Tribu des Escherichiae;
- . Tribu des Klebsiellae;
- . Tribu des Proteae;
- . Tribu des Yersinia.

Ces différentes tribus peuvent être individualisées en genres, ou en sous genres, en espèces, en sérogroupes, en sérotypes.

2.1. Tribu des Escherichiae :

Ce groupe défini par des caractères négatifs, comprend 4 genres principaux : *Eshérichia*, *Shigella*, *Salmonella* et *Citrobacter*. Les genres *Edwarsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella* et *Yokenella* qui possèdent les caractères biochimiques de définition de cette tribu sont rarement retrouvés.

Le genre *Kluyvera* qui possède les caractères biochimiques de définition de cette tribu y est rattaché.

2.1.1. Genre Eschérichia :

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce *E. coli* intéressante en bactériologie médicale et qui est l'espèce le plus fréquemment isolée dans le laboratoire de bactériologie. Les autres espèces sont : *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, et *E. vulneris*.

2.1.2. Genre Shigella :

Ce genre comprend quatre espèces correspondant à quatre séro-groupe A, B, C, D pouvant comporter un ou plusieurs sérotypes : groupe A (*S. dysenteriae*) avec dix sérotypes ; groupe B = *S. flexnerie* avec six sérotypes ; groupe C = *S. boydii* avec quinze sérotypes et groupe D = *S. sonnei* avec un seul sérotype.

2.1.3. Genre Salmonella :

Il s'agit d'un très vaste groupe bactérien comportant plus de 2000 espèces. Ce genre est divisé en cinq sous-genres, le sous genre 1 étant celui isolé le plus souvent chez l'homme. Les autres étant retrouvés chez les animaux à sang froid.

Depuis 2005, une nouvelle nomenclature est en vigueur sur le plan international (Tindall, 2005). Elle fait suite aux études moléculaires (hybridations ADN-ADN) qui ont révélé la présence de seulement deux espèces dans le genre Salmonella (*S. enterica*, espèce majoritaire et *S. bongori*, espèce rare).

S. enterica est elle-même subdivisée en six sous-espèces : *enterica* (l'ancien sous-genre I de Kauffmann), *salamae* (l'ancien sous-genre II), *arizonae* (les souches monophasiques de l'ancien sous-genre III), *diarizonae* (les souches diphasiques de l'ancien sous-genre III), *houtenae* (l'ancien sousgenre IV) et *indica*.

L'espèce *bongori* et les différentes sous espèces d'*enterica* sont ensuite subdivisées sur la base du sérotypage en de très nombreux sérotypes (François-Xavier, 2009).

Du point de vue médical, il convient de distinguer deux grands groupes chez salmonelles : les salmonelles majeures, agents de la fièvre typhoïde et des fièvres paratyphoïdes (*S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*) et tous les autres sérotypes « mineurs » responsables d'intoxications alimentaires, de gastro-entérites ou d'infections septicémiques de type opportuniste.

2.1.4. Genre Citrobacter :

Ce genre est composé de trois espèces : *C. freundii*, *C. amalonaticus* et *C. diversus*.

2.1.5. Genre Edwarsiella :

Ce genre ne compte qu'une seule espèce en bactériologie médicale : *E. tarda*.

2.1.6. Genre Kluyvera :

Il s'agit d'un genre de création récente. Il existerait au moins trois espèces dont deux ont actuellement une dénomination précise : *K. ascorbata*, *K. crycrescens*.

2.2. Tribu des Klebsiellae :

Cette tribu comporte trois genres *Klebsiella*, *Entérobacter* et *Serratia*.

2.2.1. Genre Klebsiella :

Ce genre est composé de quatre espèces *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis* et *K. ozenae*.

2.2.2. Genre Entérobacter :

Il est composé de six espèces : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae* et *E. sakazakii*.

2.2.3. Genre serratia :

Il est composé de cinq espèces : *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidea*, *S. plymuthica* et *S. odorifera*.

2.3. Tribu des proteae :

Elle comporte actuellement trois genres regroupant six espèces.

. **Proteus** : *P. mirabilis*, *P. vulgaris* et *P. alcalifaciens*.

. **Providencia** : *P. stuartii* et *P. rettgeri*

. **Morganella** : *M. morganii*.

2.4. Tribu des yersiniea :

Elle comporte sept espèces : *Y. pestis*, *Y. ruckerii*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. fredericksonii*, *Y. kristensenii*.

3. Habitat et pouvoir pathogène:

Les bactéries de la famille des Entérobactériaceae sont pour la plupart des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Ces bactéries représentent la majorité de la flore intestinale aéro-anaérobies.

4. Caractères cultureux :

Les Enterobacteriaceae se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubés 18 heures à 37°C. Sur gélose on peut obtenir différentes formes :

- Les formes S (smooth) sont d'aspect habituel au sortir de l'organisme ; lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre.
- Les formes R (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages ; rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.
- En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.
- Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, notamment *Salmonella paratyphi B*.
- Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires.

5. Caractères biochimiques :

L'identification par des techniques issues de la biologie moléculaire n'est pas encore à la portée de tous les laboratoires. La recherche des caractères généraux de la famille et la recherche des caractères biochimiques demeurant les moyens d'identification couramment mis en œuvre.

Le diagnostic des quatre tribus qui intéressent la bactériologie médicale se fait sur un nombre limité de caractères (Tableau 1).

L'identification présomptive repose sur la coloration des colonies associée à l'examen direct par coloration de Gram complétée par des tests biochimiques

Tableau 1 : Composition et caractères différentiels des tribus des Enterobacteriaceae (François Denis et al, 2007)

Tribus	Escherichiae	Klebsiellae	Proteae	Yersinia
Genres	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i> <i>Salmonella</i> <i>Citrobacter</i> <i>(Levinea*)Edwarsiella</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Entérobacter</i> <i>(Hafnia*)</i> <i>Serratia</i>	<i>Proteus</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Nouveau genre rattaché	<i>Kluyvera</i>	<i>Cedecea</i>	<i>Tatumella</i>	
TDA	-	-	+	-
Uréase	-	d	d	+(c)
Voges Proskauer à 37°C 22°C	--	d d	-(b) d	- d
Mobilité à 37°C	d	d	+(b)	+ à 22°C
Sensibilité à la colistine	+(a)	d	-(b)	d
	a = sauf <i>Edwarsiella</i>		b = sauf <i>Tatumella</i>	c = sauf <i>Y.ruckeri</i>
d = différent suivant les genres ou espèces *=synonymes				

6. Caractères antigéniques

L'identification biochimique doit être complétée pour certains genres (*Salmonella*, *Shigella*) par la sérotypie. Celle-ci n'a de sens qu'une fois le genre ou l'espèce déterminé, car les communautés antigéniques inter-espèces et inter-genres sont nombreuses. Les entérobactéries (Figure 1) possèdent plusieurs types d'antigènes différents :

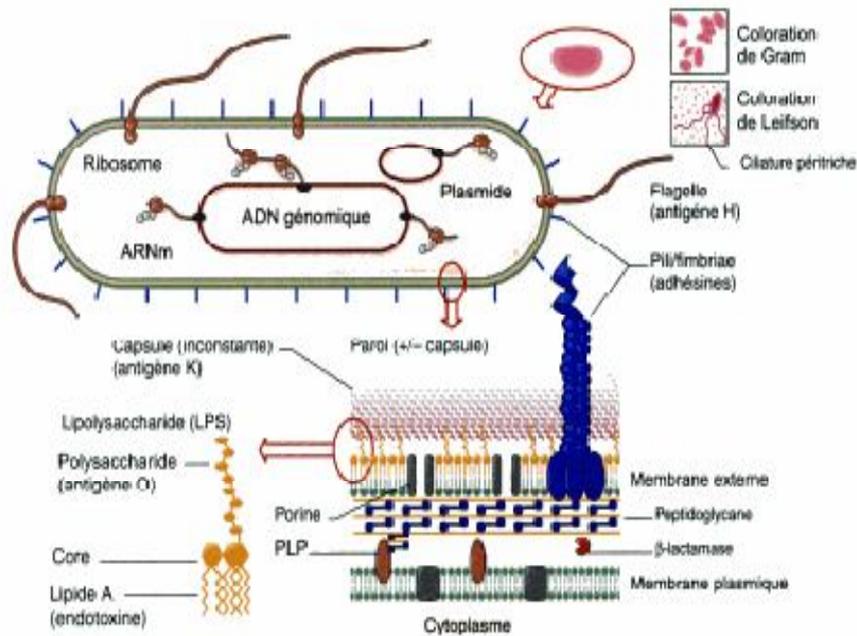


Figure 1 : Structure et aspect microscopique des Enterobacteriaceae (François et al, 2007)

6.1. Les antigènes O

Les groupes antigéniques O sont caractérisés par la présence d'un antigène somatique polysaccharidique commun qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide (François-Xavier, 2009).

Les réactions d'agglutination se produisent lentement et sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

6.2. Les antigènes H

Les antigènes flagellaires H sont des antigènes protéiques constitués d'une seule sous-unité polymérisée, la flagelline. Celles-ci pourront être mises en évidence par les sérums anti-H correspondants (François-Xavier, 2009).

Ce sont des antigènes qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutination se produisent rapidement et sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

6.3. Les antigènes K

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes rendent la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures.

Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

6.4. Antigène Kunitz

Cet antigène commun des Enterobacteriaceae n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique.

Des antisérums dirigés spécifiquement contre chacun des antigènes bactériens sont préparés en utilisant la méthode de l'absorption spécifique des anticorps de Castellani.

Des anticorps qui se sont fixés sur l'antigène bactérien correspondant forment des agglutinats. Après centrifugation, il ne reste plus dans le surnageant que les anticorps qui n'ont pas été en contact avec l'antigène.

INFECTIONS DUES AUX ENTEROBACTERIES PATHOGENES

I. Infections à *E. coli* :

Les *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des hôtes commensaux du tractus digestif de la volaille et la plupart des souches ne sont pas pathogènes. Cependant, un certain nombre de celles-ci appelées « Avian Pathogenic *E. coli* » ou APEC et appartenant à des sérotypes bien particuliers, sont associées au syndrome de la colibacillose, dont les lésions et les manifestations peuvent être variables suivant l'âge de l'animal (infection de la vésicule vitelline, colisepticémie, maladie respiratoire chronique ou CRD, salpingite, péritonite, affection chronique de la peau, « swollen-head disease », ostéomyélite) (Stordeur et Mainil, 2002).

1. Epidémiologie des infections à *E. coli* :

1.1. Etiologie

L'agent étiologique de la colibacillose est la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*).

1.2. Mode de contamination

En pathologie infectieuse aviaire deux types de transmission coexistent : la transmission horizontale entre animaux contemporains sur un même site ou sur des sites différents et la transmission verticale des reproductrices à leur descendance par l'ovule. Il était habituellement considéré que les colibacilles pouvaient se transmettre de la poule au poussin par une voie pseudo-verticale, par la contamination de la coquille de l'œuf, l'embryon se contaminant lors de l'éclosion.

1.3. Distribution

Le plus important réservoir des *E. coli* aviaires est le tractus digestif de l'animal dont 10 à 15 % de la population colibacillaire appartiennent à des sérotypes potentiellement pathogènes.

Chez le poulet, les concentrations sont de l'ordre de 10^6 colibacilles par gramme de matière fécale. Les plus grandes concentrations étant retrouvées chez les animaux de moins de 3 semaines, essentiellement au niveau du tractus digestif postérieur (Gross, 1994 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

Les *E. coli* sont très facilement véhiculées par la poussière qui constitue une source importante de contamination en élevage (Oyetunde, 1978). Ainsi, il a été démontré que la poussière présente dans les élevages pouvaient contenir jusqu'à 10^6 colibacilles par gramme et

que les sérotypes s'y retrouvant s'avéraient être identiques à ceux retrouvés dans les lésions septicémiques (Gross, 1994). On peut aussi retrouver ces bactéries dans l'alimentation et l'eau de boisson.

2. Pathogénie des infections dues aux souches APEC :

Le pouvoir pathogène de *E coli* repose sur leur capacité à coloniser l'appareil respiratoire, leur résistance au système immunitaire, leur aptitude à se multiplier dans un contexte de carence en fer, et leur pouvoir cytotoxique (Villate, 1997).

Comme évoqué plus haut, la voie d'entrée 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.

Dans une troisième étape, la bactérie atteint le sang et colonise les organes internes comme le cœur, le foie et la rate (Jordan et Pattison, 1996).

Les gènes les plus fréquemment identifiés dans les souches isolées lors de colibacilloses. Sont *Iss*, *Cva C* et *iutA*. Ils sont aussi retrouvés dans le groupe des colibacilles commensaux, mais à une moindre fréquence (Robineau, 2010).

2.1. Facteurs de virulence

2.1.1. Adhésines

Les facteurs de virulence regroupent les adhésines (ou fimbriae) impliquées dans l'adhérence des bactéries aux tissus épithéliaux (Robineau, 2010).

Les seules études actuelles ont été menées sur les fimbriae de type 1 ou F1 et les fimbriae de type P.

2.1.2. Résistance au sérum ou à la phagocytose

La résistance à l'activité bactéricide du complément ou résistance au sérum (ou *iss* pour increased survival in serum), nécessaire à la survie des bactéries dans le sang (Robineau, 2010).

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

Ainsi, il a été démontré qu'une corrélation existe entre la résistance au sérum et la virulence des souches inoculées par voie intraveineuse chez des dindes de trois semaines (Ellis et al, 1988). D'autre part, il a été démontré qu'une forte corrélation existe entre la résistance au sérum et le taux de létalité chez des poussins d'un jour (Ike et al, 1992).

2.1.3. Systèmes de séquestration du fer

La faible quantité de fer disponible dans les liquides physiologiques ne permet pas aux bactéries de pouvoir s'y multiplier. C'est pourquoi, elles ont acquis un système très efficace de captation du fer leur permettant de survivre en présence de faibles concentrations en métal. Ainsi pour capturer ce métal, certaines bactéries sécrètent de petites molécules organiques ayant de l'affinité pour le fer. On appelle ces substances des sidérophores (aérobactine, yersiniabactine, entérobactine). En même temps, ces bactéries s'équipent à leur surface de protéines spécifiques permettant l'entrée, dans la cellule, de ces complexes fer-sidérophores. (Robineau, 2010)

Plusieurs études ont montré que la plupart des souches APEC (73-98%) possède le système d'acquisition du fer appelé aérobactine, alors que les souches non pathogènes le produisent moins fréquemment (Dho et al, 1984; Lafont et al, 1987; Emery et al, 1992).

2.1.4. Toxines

Les toxines comme l'hémolysine et la cytotoxine nécrosante dont l'effet est de favoriser le franchissement de la barrière épithéliale par les colibacilles. Sont également à prendre en compte parmi ces facteurs (Robineau, 2010).

Quelques études ont démontré que les souches APEC sont capables de produire des toxines pouvant être impliquées dans le processus pathogénique.

2.1.5. Protéine Tsh

Une hémagglutinine sensible à la température est codée par le gène *tsh* (*thermo sensitive hemagglutinin*) isolé d'une souche APEC de poulet et localisé sur un plasmide. Ce gène est associé préférentiellement à ces souches APEC et ne se retrouve pas chez des souches d'*E. coli* isolées de fèces d'animaux sains (Robineau, 2010).

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

2.1.6. Capsule K1

Les polysaccharides capsulaires seraient essentiels à la virulence extra-intestinale des APEC (Gross, 1994). Ils interviendraient ainsi dans la résistance au système immunitaire, en augmentant leur résistance aux effets bactéricides du sérum et à la phagocytose via l'interaction avec le système du complément (Mellata et al, 2003).

2.1.7. Lipopolysaccharides (LPS)

Le LPS est formé d'un oligosaccharide et d'une chaîne polysaccharidique : l'antigène O. Ce dernier n'entraîne pas directement de lésion mais augmente la production de cytokines et de médiateurs de l'inflammation responsables de lésions tissulaires et vasculaires (Proctor et al, 1995). De plus, l'antigène O contribuerait à la virulence en inhibant notamment la phagocytose et la voie alterne du complément (Joiner, 1988).

2.1.8. Colicine

La colicine n'est pas à proprement parler un facteur de virulence mais plutôt un marqueur : c'est un antibiotique produit par les colibacilles qui tue les bactéries voisines, créant une niche écologique favorable à leur développement (Robineau, 2010).

3. Classification des APEC

Les premières études menées sur les colibacilles aviaires par Sojka et Carnaghan (1961) montrent que les sérogroupes les plus fréquents sont O1, O2, O35 et O78. Plus récemment, des études menées sur 112 souches d'*E. coli* isolées de cas de colibacillose au Canada par Dozois et collaborateurs (1992), ont montré que 16 sérogroupes étaient représentés parmi lesquels les sérogroupes O78 (52 %) et O1 (6 %) étaient les plus fréquemment rencontrés.

4. Etude clinique et nécropsique

4.1. Expressions cliniques des infections aviaires à *E. coli*

4.1.1. Colibacillose respiratoire

Cette pathologie constitue l'expression principale de la colibacillose. Les manifestations cliniques sont celle de la maladie respiratoire clinique : abattement, indolence, inappétence, râles, toux, éternuement, jetage et larmolement (Dufay, 1999).

Si la maladie vient compliquer une autre affection, les signes sont d'abord ceux de la maladie primaire. Si elle est primitive, son évolution sera suraiguë avec une mortalité dépassant les 20 % et un taux de mortalité inférieur à 5 % sauf complication (Villate, 1997).

Cependant, les pertes sont plus souvent d'ordre économique, avec une réduction significative de la croissance des animaux et une augmentation du coefficient alimentaire et des saisies à l'abattoir (Yogarathnam, 1995 ; Elfadil et al, 1996).

4.1.2. Septicémie et complexe respiratoire chronique

Cette pathologie constitue l'expression principale de la colibacillose et affecte particulièrement l'élevage de poulets de chair, avec un taux de mortalité pouvant atteindre dans certains cas 30 à 50 %. Cependant, les pertes sont plus souvent d'ordre économique, avec un taux de morbidité pouvant dépasser 50 %, une réduction significative de la croissance des animaux et une augmentation du coefficient alimentaire et des saisies à l'abattoir (Yogarathnam, 1995 ; Elfadil et al, 1996).

Le premier signe clinique rencontré est une chute importante de la consommation alimentaire. Ensuite, de l'abattement accompagné d'hyperthermie (42 à 44°C) se manifestent.

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

4.1.3. Dermatite nécrotique

Cette expression de la maladie consistant en l'apparition de plaques de fibrine sous la peau située dans la partie inférieure de l'abdomen, n'entraîne ni mortalité ni signes cliniques mais est responsable de pertes économiques substantielles, notamment à l'abattoir. Dans ce type de lésions, *E. coli* est toujours la bactérie qui prédomine (Gross, 1994).

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

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

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

4.1.5. Omphalites

Observées sur des poussins dès l'éclosion. Ces derniers présentent une faiblesse générale avec un tassement près des éleveuses. Le nombril, normalement résorbé en 72h, persiste et est fortement enflammé. La mortalité est élevée, les survivants accusent un fort retard de croissance (Stordeur et Mainil, 2002).

4.1.6. Arthrites et les synovites

Observées en général chez les sujets qui ont survécu à une colisepticémie ou suite à une arthrite virale (réovirus) ou bactérienne (*Mycoplasma synoviae*) ou encore à un traumatisme. L'animal trouve des difficultés pour se déplacer. Elles se manifestent par une chaleur et des douleurs à la palpation (Gorden, 1979).

4.1.7. Swollen head disease

La "*Swollen head disease*" est souvent associée à la colibacillose. 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 prédisposants comme les virus (pneumovirus, paramyxovirus, coronavirus) ou des teneurs élevées en ammoniac (White et al, 1990). La morbidité est souvent faible (1 %), mais les animaux présentant les symptômes en meurent dans la majorité des cas (Parreira et al, 1998).

La maladie apparaît le plus souvent aux alentours de la 30^{ème} semaine et les conséquences les plus importantes sont des retards de croissance qui résultent de l'infection et entraînent des pertes économiques conséquentes.

4.1.8. Ovarites et salpingites

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

Cette maladie, plus souvent chronique, apparaît lorsque le sac aérien abdominal gauche est atteint par les *E. coli*. Les bactéries se propagent alors, par contiguïté de tissu, pour atteindre l'oviducte et y persister quelques temps. Les animaux malades meurent dans les 6 mois suivant l'infection (Gross, 1994).

4.2. Etude nécropsique

4.2.1. Septicémie et complexe respiratoire chronique

Au niveau lésionnel, les organes les plus touchés sont les sacs aériens (aérosacculite), le foie (périhépatite), le cœur (péricardite) et par contiguïté de tissu, la cavité abdominale (péritonite). Au niveau du cœur, le péricarde prend un aspect opaque et œdémateux et se remplit d'un exsudat fibrineux.

Les sacs aériens quant à eux perdent leur transparence, s'épaississent et présentent un aspect congestif.

Quant aux autres organes, tels que le foie et la rate, les lésions sont surtout localisées en périphérie de ceux-ci et sont caractérisées par de la congestion, un 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 (Jordan et Pattison, 1996).

4.2.2. Omphalites

Les lésions correspondent à l'altération du sac vitellin dont le contenu est de consistance allant de aqueuse à grumeleuse et de coloration jaune brune au vert (Villate, 1997).

4.2.3. Arthrites et les synovites

Les surfaces articulaires sont normales avec du pus allant de crémeux à caséux (Gorden, 1979).

4.2.4. Swollen head disease

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

4.2.5. Ovarites et salpingites

D'un point de vue histologique, les lésions consistent en une diminution de l'épaisseur des parois de l'oviducte, la présence d'hétérophiles, de fibrine et de débris nécrotiques caséifiés (Gross, 1994).

5. Diagnostic :

Le diagnostic de la colibacillose aviaire repose d'abord sur le tableau clinique et la présence de lésions évocatrices mais non spécifiques 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.

Le diagnostic est confirmé par un isolement au laboratoire (Stordeur et Mainil, 2002).

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

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

6. Traitement

Les colibacilloses sont les infections bactériennes les plus fréquentes chez les volailles. Elles représentent vraisemblablement la première cause de traitement antibiotique dans les élevages et l'émergence de souches résistantes est une préoccupation légitime. (Robineau, 2010).

Les antibiotiques utilisés sont ceux actifs contre les Gram négatifs ou à large spectre, et leur choix est guidé par la forme de la colibacillose en présence.

6.1. Forme respiratoire

Etant donnée la fréquence de l'association colibacillose-mycoplasmoses, il est souvent indispensable d'opter pour l'association de macrolides à des aminosides telle que streptomycine-spiramycine ou streptomycine-tylosine (Villate, 1997).

6.2. Forme septicémique

L'antibiotique utilisé dans cette forme doit présenter une bonne absorption intestinale afin de pouvoir diffuser dans tout l'organisme, c'est le cas de nitrofuranes et de l'association triméthoprime-sulfamides (Borne, 1998).

6.3. Forme digestive

Dans ce cas, l'indication portera sur les antibiotiques ne traversant pas la paroi intestinale, ce qui permettra leur concentration dans le tube digestif. Les aminosides (colistine) et leurs apparentés (spectinomycine) sont les plus indiqués (Lecoanet, 1992)

Les antibiotiques les plus utilisés sont les sulfamidés, les bêtalactamines, et les quinolones.

7. Prophylaxie :

7.1. Prophylaxie sanitaire

Elle vise à contrôler les contaminations environnementales, les vecteurs animés ou inanimés, afin de réduire au maximum les facteurs prédisposant aux infections respiratoires.

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

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

environnementaux comme l'humidité, la ventilation, la teneur en poussière et en ammoniac dans l'air (Oyetunde et al, 1978).

Les rongeurs, les insectes parasites, coprophages, nécrophages sont aussi des réservoirs potentiels de colibacilles et doivent être systématiquement détruits.

La qualité de l'eau de boisson est aussi très importante, il faut dès lors veiller à la changer très régulièrement.

Des mesures générales de séparation des animaux par classes d'âge et par espèce, de nettoyage, de désinfection et de vide sanitaire entre chaque lot sont aussi des mesures de prévention indispensables dans le cadre de la lutte contre la colibacillose (Jordan et Pattison, 1996).

7.2. Prophylaxie médicale

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 (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Ceci n'est pas surprenant, étant donné l'énorme diversité que représentent les souches APEC en matière de facteurs de virulence et le peu de données concrètes à leur sujet.

II. Infections à *Salmonella* :

1. Salmonelloses aviaires :

Les salmonelloses sont des maladies infectieuses, contagieuses, transmissibles à l'homme et à diverses espèces animales, dues à la présence d'un germe du genre *Salmonella* de la famille des Enterobacteriaceae (Lecoanet, 1992).

La salmonellose a été identifiée dans de nombreux pays, mais semble être plus fréquente dans les zones d'élevage intensives, particulièrement dans les élevages de volaille

2. Epidémiologie des infections à *Salmonella*

2.1. Etiologie

L'agent étiologique de la salmonellose est la bactérie *Salmonella Enterica*.

2.2. Mode de contamination de la volaille

La contamination de la volaille peut se faire par deux voies : la voie verticale et la voie horizontale.

2.2.1. Transmission verticale

Elle résulte d'une infection de l'ovaire ou de l'oviducte de la pondeuse par un sérotype adapté de salmonelles. C'est essentiellement *S. Enteritidis* et plus rarement *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, qui ne se traduit pas nécessairement par des signes cliniques, mais par un décrochement de la courbe de ponte suivi d'un rattrapage rapide. Les salmonelles colonisent les milieux intérieurs de l'œuf. Les poussins issus de ces œufs infectés sont viables et éclosent infectés par la souche de salmonelles d'origine maternelle (Van Immerseel et al, 2005).

2.2.2. Transmission horizontale

Elle peut débuter dès le couvoir, où les œufs sont contaminés au niveau des coquilles à la ponte, sans pénétrer dans l'œuf, mais persiste sur la cuticule. Le poussin est infecté dès l'éclosion par contact avec la coquille infectée. De plus, dans les claies des couvoirs, une inter-contamination par création et diffusion d'un aérosol contaminé est prouvée (Gradel et al, 2003). Les pratiques de gestion dans toute la filière volaille ont un effet profond sur la transmission et la persistance des salmonelles dans les systèmes de production de la volaille. C'est aussi le cas des modes de transmission par la litière, l'eau, l'alimentation, les nuisibles, le personnel, etc. (Carlier et al, 2001).

2.3. Distribution

Le réservoir des bactéries du genre *Salmonella* est principalement le tube digestif des vertébrés. De très nombreuses espèces animales hébergent ces agents pathogènes (volailles, bovins, porcs, poissons, reptiles, etc).

La source principale est bien sûr l'animal malade ou porteur qui excrète les bactéries, que ce soit en couvoir, en élevage ou en abattoir, qui propage le germe par les excréments ou par les œufs infectés.

La contamination de l'environnement par les salmonelles est une évidence; Ces germes peuvent être retrouvés à peu près partout: déjections animales, sols, les points d'eau, effluents, animaux sauvages, et domestiques, flore sauvage etc. Il suffit de les chercher pour les mettre en évidence (François-Xavier, 2009).

3. Pathogénie et virulence

3.1. Pathogénie

Les salmonelles sont des bactéries entéropathogènes invasives, capable de pénétrer, survivre et souvent se multiplier dans divers types de cellules eucaryotes, dont les cellules épithéliales et phagocytaires, entraînant, en fonction du sérotype et de l'hôte, des expressions allant de la gastro-entérite à l'infection systémique (Lecoanet, 1992 ; Baiod, 1997).

En cas d'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, elles parviennent au niveau de l'intestin grêle où elles se multiplient. Elles détruisent la bordure en brosse des cellules intestinales, puis, pénètrent dans les cellules par une invagination de la membrane. Leur réplication et leur dissémination dans l'organisme se fait lorsque l'inoculum dépasse les capacités défensives du tube digestif. La dose minimum infectante est généralement de l'ordre de 10^5 à 10^8 bactéries/ml, quelquefois, inférieure à 10 bactéries (Flandrois, 1997 ; Fosse et Magras, 2004 ; Nauciel et Vilde, 2005).

3.2. Facteurs de virulence

Un certain nombre de facteurs de virulence ont été étudiés chez les APEC. Ces facteurs de virulence regroupent les adhésines, les adhérences, l'invasion et la colonisation de l'organisme, la survie et la capacité de multiplication intracellulaire, le système de captation du fer, la survie dans le sérum et les toxines.

4. Etude clinique et nécropsique

La contamination des œufs par les salmonelles peut mener à un niveau très élevé de mortalité embryonnaire et une mort rapide des poussins nouvellement éclos, avant l'observation de signes cliniques (Gast, 1990).

Les signes de la maladie sont rarement observés après les deux premières semaines de la vie.

Chez l'embryon, les lésions de la pullorose se résument en une nécrose du jaune et une dégénérescence du foie qui est de couleur jaune brunâtre.

Chez les poussins ayant succombé les jours qui ont suivi l'éclosion, on note juste une légère hypertrophie et congestion du foie, une congestion des poumons, persistance du sac vitellin dont le jaune peut être de coloration jaune brunâtre ou verdâtre, de forme régulière ou bosselée, de consistance élastique ou pâteuse avec contenu aqueux ou gélatineux ou caséux et parfois sanguinolent (Villate, 1997).

Dans la plupart des cas, les volailles sont des porteurs sains où la maladie évolue sous forme chronique et les salmonelles excrétées de façon intermittente (Rostagno et al. 2006).

La paratyphose c'est la forme aiguë qui se manifeste chez les sujets de cinq (05) à vingt et un (21) jours d'âge et qui présentent des signes de prostration avec yeux mi-clos, duvet hérissé, ailes tombantes, inappétence, soif intense. Une diarrhée aqueuse, profuse, blanchâtre et crayeuse, parfois sanguinolente et de mauvaise odeur apparaît après quelques jours et le sujet se tient alors en boule, ventre ballonné, respirant difficilement. Une conjonctivite et une kératite sont souvent observées (Lesbouyries, 1965).

Sur le plan lésionnel, l'intestin, principalement dans la région duodénale, contient du caséum qui recouvre, souvent, des lésions d'entérite ulcéreuse. Les séreuses sont piquetées de pétéchies. La muqueuse de l'œil et des premières voies respiratoires et digestives sont recouvertes d'une mince couche de fibrine. Une dégénérescence du myocarde avec œdème pulmonaire et parfois une pneumonie sont observés. Le foie est hypertrophié et friable, les reins et la rate sont congestionnés de couleur rouge brunâtre (Lesbouyries, 1965).

Dans le cas de la typhose aviaire, la mortalité augmente rapidement et des symptômes graves apparaissent se manifestant, d'abord, par un abattement, une fièvre, une cyanose intense des appendices (crêtes, barbillons : maladie de la crête bleue) puis par des symptômes digestifs : diarrhée aqueuse, jaune verdâtre striée de sang, fétide aboutissant à l'amaigrissement. Des symptômes respiratoires et des symptômes nerveux sont aussi notés (Sonaiy et Swan, 2004).

Les lésions sont caractérisées dans les formes foudroyantes par des suffusions de sang dans tous les organes tandis que dans les formes habituelles, nous ne remarquons l'hypertrophie et la congestion que sur le foie et la rate qui sont aussi siège de nécrose. En plus, le foie est parsemé de larges bandes rougeâtres et jaunâtres quelquefois avec une couleur vert bronzé caractéristique (Villate, 1997).

5. Diagnostic

Le diagnostic repose essentiellement sur l'isolement et l'identification de l'agent étiologique. Il peut faire appel à différentes méthodes (Euzéby, 1997).

5.1. Méthodes bactériologiques

Utilisables dans tous les cas et sur tous les types de prélèvements, mais restent mieux adaptées à la mise en évidence des infections aiguës, systémiques qu'à la recherche des infections chroniques de l'adulte, où, le germe, localisé à l'état latent au niveau des gonades, du foie ou de la rate mais rare dans l'intestin, n'est excrété que de façon intermittente, rendant aléatoires les tentatives d'isolement à partir d'écouvillonnage cloacaux ou de litière (Lecaonet, 1992).

L'identification se fera à partir du sang du cœur, du foie, de la rate, du rein, du vitellus et du cerveau (Villate, 1997).

Les prélèvements sont ensemencés en milieux appropriés d'enrichissement (Muller Kaufman, sélénite et cystine, tétrathionate additionné de novobiocine, Rappaport) et d'isolement (gélose Hecktoen, gélose lactosé de mac Conkey, gélose SS, gélose au vert brillant ou au désoxycholate, gélose lactosé au BCP) (Villate, 1997).

L'identification biochimique ou Biotype : Repose sur la mise en évidence des caractères biochimiques différentiels permettant de classer les souches selon leurs activité métabolique par l'utilisation de sucre et /ou leur activité enzymatique (Lecoanet, 1992 ; Humbert, 1998).

L'identification sérologique ou sérotypage : C'est le résultat de multiples combinaisons des antigènes somatiques O, capsulaires Vi et flagellaires H (Brisabois, 2001).

La classification repose d'abord sur l'appartenance à des groupes antigéniques (groupe O2, O4, O9) puis au sein de chacun d'entre eux ; selon les antigènes flagellaires de la phase 1 et de la sous espèce Enterica (Avril et Eaucher, 2002).

La lysotypie : Basée sur l'étude de la sensibilité ou de la résistance d'une souche à une série de macrophages sélectionnés (Clinquart et al, 2004).

L'antibiotype : Etudie la réponse bactérienne aux antibiotiques (Regnault, 2002).

La bactériocinotypie : Repose sur la recherche de la population de bactériocines ou de la sensibilité à ceux-ci. Son application reste réservée car très peu de souches produisent la colicine (Millemann, 1998).

5.2. Méthodes sérologiques

Permettant la mise en évidence des anticorps agglutinants par agglutination rapide sur lame (ARL) ou la microagglutination lente en tube (MAL) nécessitant une mise au point d'antigène standardisés mais fournissent un pourcentage variable de résultats faussement positifs ou faussement négatifs (Bouthy et al, 1988).

5.3. Méthodes histologiques

Permettant de compléter et d'améliorer un examen bactériologique infructueux par l'administration de traitement ou additif (antibiotiques), en mettant en évidence, notamment au niveau du foie, des lésions caractéristiques de l'infection salmonellaire (Lecooanet, 1992).

5.4. Méthodes de caractérisation des souches de salmonella

Ce sont des méthodes qui basent sur l'étude du matériel génomique de la cellule bactérienne par l'utilisation de marqueurs génotypiques (Beraud, 2001). Elles permettent l'analyse de l'ADN total chromosomique ou plasmidique.

6. Traitement

L'efficacité de la médication par les antibiotiques pour traiter et prévenir les infections à salmonelles ubiquitaires est le sujet d'importants débats; en effet l'utilisation des antibiotiques a montré l'efficacité pour contrôler l'évolution des salmonelles mais l'utilisation anarchique est souvent à l'origine de graves problèmes de résistance bactérienne et ainsi d'une plus grande dissémination pendant des temps plus allongés de la part des volailles.

7. Prophylaxie

7.1. Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale est basée sur :

- Les additifs Alimentaires *anti-Salmonella* (l'acidification de l'eau de boisson, les prébiotiques et les probiotiques).

- L'antibio- prévention ;

- La vaccination.

7.2. Prophylaxie sanitaire

Les barrières sanitaires représentées par les mesures générales d'hygiène sont les premiers éléments à mettre en place avant l'emploi des procédés spécifiquement adaptés à la lutte contre le danger *Salmonella* ou tout traitement (Carlier et al, 2001). Les mesures à prendre sont :

- Clôture et isolement strict des élevages ;
- Désinfection et vide sanitaire entre bandes successives (Van Immerseel et al, 2005) ;
- Propreté de l'environnement immédiat en évitant l'épandage de litière à proximité des élevages ;
- Evacuation des salissures vers des fosses septiques ou réseaux d'eau usée ;
- Dératisation et désinsectisation ;
- La propreté et le lavage des mains, le changement et désinfection des bottes sont essentiels pour la protection des bâtiments d'élevages (Bell, 2002).

I. Antibiotiques :

1. Définition :

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes. (Yala, 2001).

D'après les bactériologistes, les antibiotiques sont des composés naturels ou chimiques qui agissent à faibles doses sur les micro-organismes et qui n'ont pas de toxicité sur l'hôte.

2. Mécanismes d'action

Les antibiotiques agissent essentiellement par l'inhibition spécifique d'une étape précise d'une fonction bactérienne. Ils se fixent sur des sites moléculaires de la cellule bactérienne entraînant ainsi la perturbation de diverses réactions métaboliques, sans affecter la cellule hôte, ce qui nécessite la connaissance, de plus en plus précise, des fonctions spécifiques et vitales de la bactérie, lesquelles, pourraient constituer des cibles potentielles. Ces dernières sont caractéristiques de chaque famille (Poyart, 2003).

La plupart des antibiotiques inhibent des voies métaboliques de la bactérie. Chaque famille d'antibiotique possède son site d'action propre (Figure2)

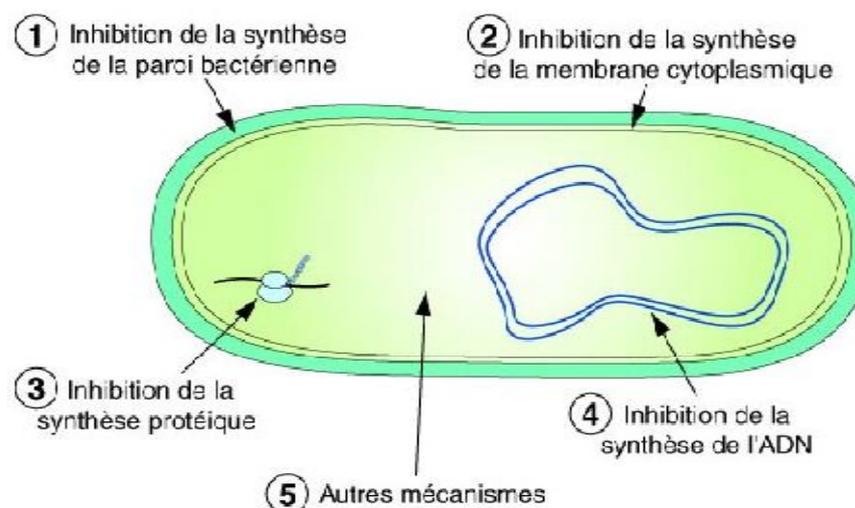


Figure 2 : mode d'action des antibiotiques (www.bacteriologie.net).

3. Usage des antibiotiques en espèce aviaire

La distribution d'antibiotiques aux animaux est effectuée sous deux types de statuts :

- en tant qu'additif dans un aliment supplémenté, cela pour obtenir un effet facteur de croissance ou en vue d'une prophylaxie anti-coccidienne par exemple ;
- en tant que médicament vétérinaire, par la distribution dans un aliment médicamenteux, dans l'eau de boisson ou par administration individuelle, cela dans le cadre d'un traitement préventif ou curatif.

Bien que les antibiotiques autorisés en tant qu'additifs aient un pouvoir sélectionnant faible (ils appartiennent à des familles chimiques non utilisés chez l'homme) en comparaison de certains antibiotiques utilisés en thérapeutique, comme les tétracyclines et les pénicillines, leur emploi est susceptible de sélectionner des bactéries résistantes.

La liste des additifs de la catégorie « antibiotiques », autorisés a été considérablement réduite au cours des dernières années du fait de mesures prises pour diminuer leur impact sur les résistances bactériennes.

90% des antibiotiques destinés aux animaux seraient incorporés dans l'alimentation, tout usage confondu (facteurs de croissance, préventif, curatif) avec 20% utilisés spécialement chez les volailles (Bories et Louisot, 1998).

Les antibiotiques les plus utilisés sont les sulfamides, l'enrofloxacin, la streptomycine, la gentamicine, les tétracyclines et la fluméquine, etc. (Lecoanet, 1992; Humbert et al, 1997).

II. Résistance bactérienne aux antibiotiques :

1. Définitions :

La résistance bactérienne à un antibiotique est définie comme la capacité d'une bactérie à survivre à une concentration définie de cette molécule. En pratique, cette résistance se traduit de différentes façons. Pour le clinicien, c'est l'absence de guérison bactériologique après un traitement adapté et mené selon un bon protocole. Pour le bactériologiste, c'est l'acquisition par une bactérie de mécanismes lui permettant de résister à la concentration minimale inhibitrice déterminée pour des souches sensibles. Pour l'épidémiologiste, il s'agit des groupes de souches se distinguant du reste de la population par une concentration minimale inhibitrice plus élevée que la moyenne.

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration plus élevée de cet antibiotique que la concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce.

2. Types de résistance :

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait, donc, partie du patrimoine génétique normal du germe (Yala et al, 2001).

Elles sont dues soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique.

La résistance acquise est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare soit par transfert d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanisme le plus fréquent) (Yala et al, 2001).

L'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques a une expression phénotypique variable. Dans la majorité des cas, elle est détectable par les méthodes habituelles de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

3. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques :

En pratique, la pression de sélection et ces différents types de support génétiques permettent à la bactérie d'acquérir un mécanisme d'échappement à l'action de l'antibiotique.

Les mécanismes de résistance sont multiples, plus ou moins spécifiques, et correspondent aux modes d'actions des grandes familles d'antibiotiques.

3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Un des mécanismes de résistance les plus répandus et des plus efficaces consiste, pour les bactéries, à modifier la structure même de l'antibiotique de façon à lui faire perdre sa capacité à se lier à sa cible cellulaire et, par voie de conséquence, à inhiber.

Le principal mécanisme de résistance est la production de bêtalactamases, enzymes qui hydrolysent le cycle bêtalactame et rendent donc la bactérie résistante à certaines bêtalactamines.

La bactérie synthétise une bêtalactamase qui va hydrolyser le cycle bêtalactame.

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 (Jean-Philippe et al, 2002).

Les bêtalactamases responsables de la résistance aux bêtalactamines à large spectre, habituellement actives contre les bacilles à Gram négatif.

Ces enzymes dérivent, par mutation, de pénicillinases (*TEM*, *SHV*) d'origine plasmidique. Elles sont produites, à l'heure actuelle, par de nombreuses entérobactéries comme *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* et plus rarement par *E. coli* (moins de 0,1% en France).

3.2. Résistance par diminution de la perméabilité

Il est intéressant de noter que la modification de la perméabilité membranaire représente un évènement important dans la résistance bactérienne aux antibiotiques (Jean-Marie, 2003).

Les porines sont des protéines formant des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif et permettant le passage de certaines molécules hydrophiles (pénicillines à large spectre, céphalosporines, aminosides, phénicolés, tétracyclines).

Des mutations peuvent entraîner la perte de certaines porines et de ce fait entraver la pénétration de certains antibiotiques. Ces mutations peuvent entraîner la résistance aux plusieurs familles d'antibiotiques simultanément.

3.3. Résistance par modification de la cible

La modification du site d'action peut être obtenue par inhibition de la liaison de l'antibiotique à sa cible suite à une reprogrammation ou camouflage de cette dernière ou par le remplacement de la cible par une molécule pour laquelle l'antibactérien aura une affinité moindre. Ces molécules, des protéines structurales ou des enzymes produites par les bactéries, altèrent ou se substituent aux protéines qui sont les cibles normales des antibiotiques.

3.4. Excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par exportation active grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou au contraire responsables de MDR (multidrug resistance).

Le phénomène a été décrit surtout chez les bactéries à Gram négatif.

Chez les bactéries à Gram négatif, le séquençage des génomes entiers des bactéries pathogènes révèle la présence de nombreux gènes candidats encodant des pompes d'efflux, donc potentiellement impliqués dans la résistance. Même si l'efflux est souvent responsable de niveaux modérés de résistance, il peut contribuer à des diminutions d'activité des

antibiotiques lors de l'association de plusieurs pompes, ou par synergie avec d'autres mécanismes (Vincent Cattoir, 2004).

Les principaux types de résistance, en fonction de la famille d'antibiotiques considérée, sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Sanders, 1999).

Antibiotiques	Mécanismes de la résistance (élément bactérien en cause)
Bétalactamines	Modification de la cible (Penicillin Binding Protein) Altération du système d'influx Hydrolyse du cycle bêtalactame Système d'efflux actif
Tétracyclines	Protection du ribosome Altération du système d'influx Inactivation par une enzyme oxygène tétracycline dépendante Système d'efflux actif
Chloramphénicol	Altération du système d'influx Inactivation par des acétyl-transférases Système d'efflux actif
Macrolides, lincosamides	Activation d'une méthylase modifiant le site d'action ribosomal Mutation modifiant le site d'action ribosomal Système d'efflux actif Dégradation enzymatique de l'antibiotique
Aminoglycosides	Mutation modifiant les sites d'action du ribosome Modification enzymatique de l'ARNr 16S Altération du système d'influx Dégradation enzymatique de l'antibiotique
Fluoroquinolones	Mutation modifiant le site d'action sur la topoisomérase Altération du système d'influx Système d'efflux actif
Glycopeptides	Modification de la cible dans la structure de la paroi bactérienne Séquestration de l'antibiotique dans la paroi bactérienne
Sulfamides, triméthoprim	Surproduction de la cible de l'antibiotique Modification du métabolisme

4. Support génétique de la résistance :

Le siège de la résistance naturelle est le génome bactérien.

La résistance acquise est due à une mutation chromosomique ou à une acquisition de gène (résistance extra-chromosomique).

4.1. Résistances mutationnelles ou mutations chromosomiques :

Elles sont dues aux mutations de gènes existants.

Elles sont :

- spontanées : elles existent avant l'utilisation d'antibiotique et ne sont donc pas provoquées par la présence d'antibiotique.
- stables : elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien.
- spécifiques : elles ne concernent qu'un seul antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques. Dans ce cas, la résistance à un antibiotique peut aboutir à une résistance croisée pour des antibiotiques appartenant à une même famille.
- rares : le taux de mutation est faible et est de l'ordre de 10^{-7} et 10^{-8} .

Les résistances chromosomiques sont rares en clinique.

4.2. Résistances extra-chromosomiques :

Elles ont pour support un plasmide ou un transposon. Ce mécanisme de résistance est certainement le plus fréquent en clinique (80 à 90% de souches résistantes).

Elles ont les caractéristiques suivantes :

- elles sont fréquentes : c'est cette forme de résistance qui est la plus souvent rencontrée.
- elles sont contagieuses et ont une transmission horizontale entre bactéries cohabitantes de même espèce ou d'espèces différentes.
- elles peuvent concerner plusieurs antibiotiques ou plusieurs familles d'antibiotiques et peuvent entraîner des polyrésistances.

A. Plasmides :

Ce sont des molécules d'ADN bicaténaires, circulaires extra-chromosomiques, douées de répllication autonome, qui sont transmises de façon stable au cours des générations et qui peuvent exister séparément du chromosome bactérien ou y être intégrées.

Une bactérie pathogène est fréquemment résistante aux antibiotiques parce qu'elle contient un plasmide de résistance porteur d'un ou de plusieurs gènes de résistance : ce sont des plasmides R (plasmides de résistance).

Chez les bactéries pathogènes d'origine animale, la résistance multiple est principalement plasmidique, souvent transférable

Le facteur de résistance est formé de plusieurs déterminants génétiques :

- caractères de résistance (souvent à plusieurs antibiotiques à la fois),
- gènes de transfert d'une bactérie résistante à une bactérie sensible,
- d'autres gènes éventuels.

Les plasmides de résistance peuvent conférer la résistance à un ou plusieurs antibiotiques appartenant à des familles différentes.

L'information génétique est portée par des plasmides, transférables à d'autres bactéries par conjugaison, transduction ou transformation (Yala et al, 2001).

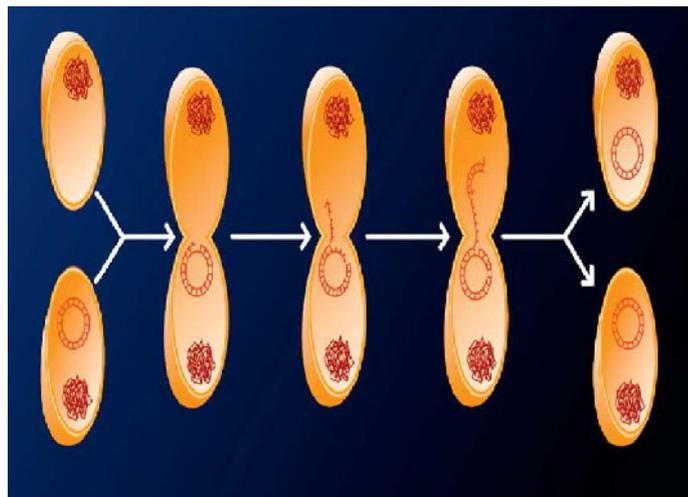


Figure 3: Représentation schématique de conjugaison plasmidique (Périchon et Courvalin, 2009).

B. Transposons :

Les transposons sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon sur un autre (transposition intermoléculaire) ou en un autre site du même réplicon (transposition intra-moléculaire), en absence d'homologie entre les ADN qui interagissent et indépendamment des fonctions de recombinaison réciproque de la bactérie-hôte.

Le caractère transposable chez la majorité des gènes est responsable de l'apparition des souches multi-résistantes.

C. Intégrons et « gènes cassettes »

Les intégrons sont de nouveaux éléments génétiques contenant un ou plusieurs gènes de résistance sous forme de cassettes. Les cassettes sont des unités mobiles qui peuvent être facilement intégrées dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique de site. Les intégrons ont surtout été étudiés chez les bactéries à Gram négatif.

Les intégrons jouent donc probablement un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien (Ploy et al, 2005).

5. Transfert de matériel génétique (Diffusion de la résistance chez les bactéries)

Chez les bactéries, les gènes de résistance sont transmis à la descendance (transmission verticale). Ils peuvent aussi être transmis, par conjugaison ou transformation, à d'autres bactéries de la même espèce et plus rarement à des bactéries appartenant à des espèces différentes (transmission horizontale) ce qui réalise une transmission épidémique de la résistance.

5.1. Transformation :

Des fragments d'ADN bactérien (pouvant être libérés lors de la lyse bactérienne) peuvent pénétrer dans d'autres bactéries et s'intégrer par recombinaison dans leur ADN. Ce processus ne s'observe que dans certaines espèces bactériennes, appartenant notamment aux genres *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*. Il faut en outre que la bactérie recevant le fragment d'ADN soit dans un état particulier, dit de compétence.

5.2. Transduction

Le transfert de matériel génétique fait intervenir ici des virus de bactéries, les bactériophages (ou phages). Comme les autres virus, les phages ne possèdent qu'un seul type d'acide nucléique entouré d'une coque protéique. Un phage ne peut se fixer sur une bactérie que si elle possède, à sa surface, un récepteur spécifique, d'où l'étroite spécificité d'action des bactériophages. Après s'être fixé, le phage injecte son acide nucléique (le plus souvent de l'ADN) dans la bactérie.

S'il s'agit d'un phage tempéré, l'ADN du phage va s'intégrer dans le chromosome bactérien, en général au niveau d'un site défini, sous forme de prophage.

5.3. Conjugaison

C'est probablement le mécanisme le plus fréquent dans la nature. C'est un transfert d'ADN entre deux bactéries accolées. Le transfert se fait d'une bactérie donatrice vers une bactérie réceptrice. La bactérie donatrice exprime à sa surface des structures permettant l'accolement (pili sexuels chez les bacilles à Gram négatif, adhérences chez les Gram positif).

6. Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones

L'impact des différents mécanismes de support plasmidique, qui ne concernent pour l'instant que les entérobactéries, est encore peu connu en pratique clinique, mais pourrait contribuer, par le biais d'une sensibilité diminuée, à la sélection ultérieure de mutants résistants. Les divers mécanismes de résistance aux quinolones sont :

- Diminution de la concentration intracellulaire d'antibiotique
- Inactivation de l'antibiotique
- protection de la cible
- Modifications de la cible suite à la mutation des gènes de structure, diminuant l'affinité de l'antibiotique pour sa cible.

Classiquement, les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries résultent essentiellement de modifications ponctuelles des cibles, les topo-isomérases, et plus rarement d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes d'efflux (Hooper, 2001).

Les déterminants de ces mécanismes de résistance sont chromosomiques, c'est-à-dire stables et non transférables. Ils ne sont pas associés physiquement à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques.

Depuis 1998, la découverte de gènes de support plasmidique impliqués dans la résistance aux quinolones chez les entérobactéries a suscité de nombreuses études épidémiologiques qui ont mis en évidence leur large diffusion au sein d'éléments génétiques mobiles, transférables horizontalement. Il s'agissait d'un mécanisme de résistance jusque-là inconnu dit « Qnr ». Ce déterminant de résistance est une protéine qui s'intercale entre les topo-isomérases de type II

(gyrase) et les quinolones et fluoroquinolones bloquant ainsi tout ou partie de leur activité antibiotique (Tran, 2005).

Enfin, l'origine des gènes du type *qnr* ou leur réservoir demeurent inconnus. La sélection de ces gènes peut être la résultante d'une pression de sélection par des quinolones et fluoroquinolones en médecine humaine, en médecine vétérinaire ou dans l'environnement. En effet plusieurs quinolones et dérivés sont utilisés en médecine vétérinaire et les entérobactéries font partie des rares espèces bactériennes qui s'échangent facilement entre l'homme et l'animal.

7. Biologie moléculaire et détection de la résistance aux antibiotiques

La PCR peut être utilisée pour l'étude de la résistance aux antibiotiques dans trois indications : pour interpréter une CMI limite et arbitrer en catégorie sensible ou résistant, pour détecter un gène de résistance directement à partir d'un prélèvement, pour étudier la dissémination de gènes de résistance, dans un but épidémiologique (Bébéar et al, 1998).

La PCR déjà bien connue a été largement décrite dans de nombreux articles. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une enzyme thermorésistante, l'ADN polymérase (la plus connue étant la Taq ADN polymérase) qui recopie en de nombreux exemplaires l'ADN cible à l'aide de deux amorces complémentaires respectivement des brins sens et antisens.

Le processus d'amplification est exponentiel. Chaque cycle aboutit à la formation de deux copies par brin (Lamoril, 2007).

La PCR est une succession cyclique de trois étapes.

- La première étape consiste à dénaturer l'ADN cible par la chaleur.
- La deuxième étape correspond à l'hybridation d'amorces complémentaires de séquences encadrant la zone à amplifier.
- Au cours de la troisième étape, l'élongation des amorces permet de synthétiser un brin complémentaire de la zone cible. L'amplification est donc exponentielle et permet la fabrication d'une grande quantité d'ADN (Jean-Louis et al, 2001).

La PCR a été déclinée de différentes manières. Nous donnerons quelques exemples sans être exhaustifs :

- La PCR classique : il s'agit de la PCR telle qu'elle a été initialement décrite. Après amplification, la cible est détectée sur un gel d'agarose après addition d'un agent intercalant (BET : bromure d'éthidium) et exposition aux UV ;
- La PCR multiplex : plusieurs couples d'amorces sont ajoutés dans un même tube et la PCR s'effectue en même temps pour chaque couple d'amorces. La PCR multiplex permet donc la mise en évidence de plusieurs cibles dans un seul tube. Elle peut être réalisée de manière conventionnelle (PCR classique), par PCR–Elisa ou par PCR en temps réel;
- La PCR en temps réel : En sus des amorces utilisées pour la PCR proprement dite, une ou deux sondes (selon la technique utilisée) sont ajoutée(s) au milieu réactionnel. La/les sonde(s) est/sont marquée(s) par un fluorophore permettant la détection directe du produit amplifié (Lamoril, 2007).

8. Impact de la résistance aux antibiotiques

La résistance des bactéries d'origine animale constitue une menace sérieuse pour la santé publique et pour la santé animale. Cette question soulève de plus de préoccupations avec la présence de souches pathogènes multi-résistances (Andremont, 2002).

Les conséquences immédiates de la résistance aux ATB sur l'élevage sont :

- L'échec thérapeutique entraînant une mortalité accrue lorsqu'un traitement alternatif n'est pas disponible ;
- La prolongation de la durée de l'excrétion fécale des bactéries dans les populations animales ;
- L'incapacité de lutter contre certaines infections pouvant accroître leur propagation en les rendant plus accessibles pour infecter les humains ou l'environnement (Devie et al, 2006)

RESULTATS ET DISCUSSION :**1. Lésions**

La colibacillose constitue vraisemblablement l'une des pathologies bactériennes majeures la plus fréquemment rencontrée en élevage aviaire dans notre pays. Elle est responsable de pertes considérables et a contribué significativement au renchérissement des coûts de production de part les fortes mortalités des volailles, les baisses des performances zootechniques qu'elle occasionne et l'augmentation des charges liées aux traitements médicamenteux qui en découlent.

Les symptômes ne sont pas spécifiques et varient avec l'âge, les organes atteints et les maladies concomitantes. Le tableau lésionnel a révélé des lésions caractéristiques de la colibacillose : hyperhémie et hypertrophie du foie et de la rate, aérosacculite, péricardite et périhépatite (figure 8, 9, 10, 11).

La répartition des lésions en fonction des types d'élevage est illustrée dans le tableau N°5:

Tableau 5 : Répartition des lésions en fonction des types d'élevage (%).

lésions	PC	PP	PRC	PRP	M T
Hépatomégalie	52,33	20,42	12,12	10,66	34,51
Aérosacculite	48,66	15,23	20,36	15,44	31,78
Splénomégalie	40,52	18,44	16,66	07,33	28,59
Péricardite	28,33	08,22	14,23	13,56	20
Entérite	15,55	03,66	06,94	04,63	10,40

PC : poulet de chair, PP : poule pondeuse, PRC : poulet repro-chair, PRP : poulet repro-ponte, M T : moyenne totale.

Nos résultats montrent que les lésions les plus couramment trouvées durant cette étude sont l'hépatomégalie, l'aérosacculite, et la splénomégalie avec des taux respectifs de 52,33 %, 48,66% et 40,52 %, chez le poulet de chair.

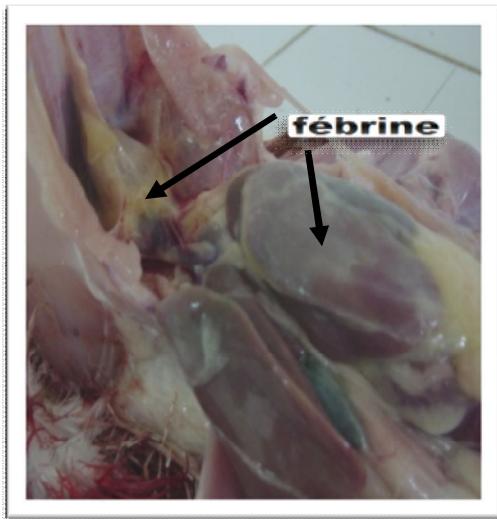


Figure 7: Péricardite avec dépôt de fibrine jaunâtre en « omelettes » dans le cœur et le foie



Figure 8 : Aérosacculite avec dépôt de fibrine jaunâtre en « omelettes » dans les sacs aériens.

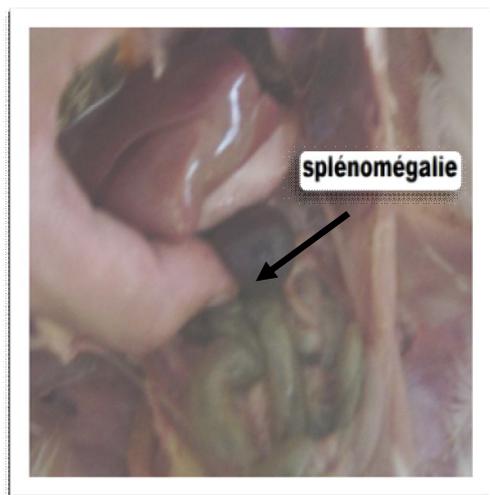


Figure 9: Splénomégalie

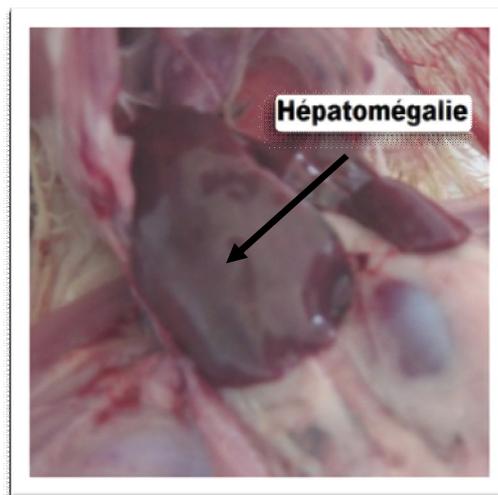


Figure 10: Hépatomégalie

La colibacillose, dont la voie d'entrée principale est le tractus respiratoire, engendre des lésions et des manifestations qui peuvent être variables suivant l'âge de l'animal et affecte essentiellement les élevages de poulets de chair.

Les bactéries colonisent les voies respiratoires profondes, à savoir les sacs aériens et les poumons, mis en relief dans nos résultats par le taux assez conséquent des aérosacculites soit 48,66% chez les poulets de chair et 20% chez les poulettes repro-chair.

Ensuite, la bactérie atteint le sang et colonise les organes internes comme le cœur, le foie et la rate (Jordan et Pattison, 1996) ; à l'origine de l'apparition d'un certain type de lésions reflété dans notre travail par des péricardites, (28,33% et 14,23% chez les poulettes repro-chair),

des hépatomégalies (52,33% chez le poulet de chair et 20,42% chez la poule pondeuse) et des splénomégalies (40,52% chez le poulet de chair et 18,44% chez la poule pondeuse). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Aggad et al, en 2010, (congestion de la rate : 37 %, périhépatite : 56 %, aérosacculite : 28 % et péricardite : 60 %) lors d'une étude composée de 84 sujets de poulets de chair autopsiés provenant de deux régions : Tiaret et Tlemcen.

2. Bactériologie

Au cours de cette étude, 240 souches appartenant à 8 espèces d'entérobactéries ont été isolées au sein du service de bactériologie médicale du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem. Ces souches sont réparties en fonction de la nature des prélèvements et de la région.

2.1. Souches isolées :

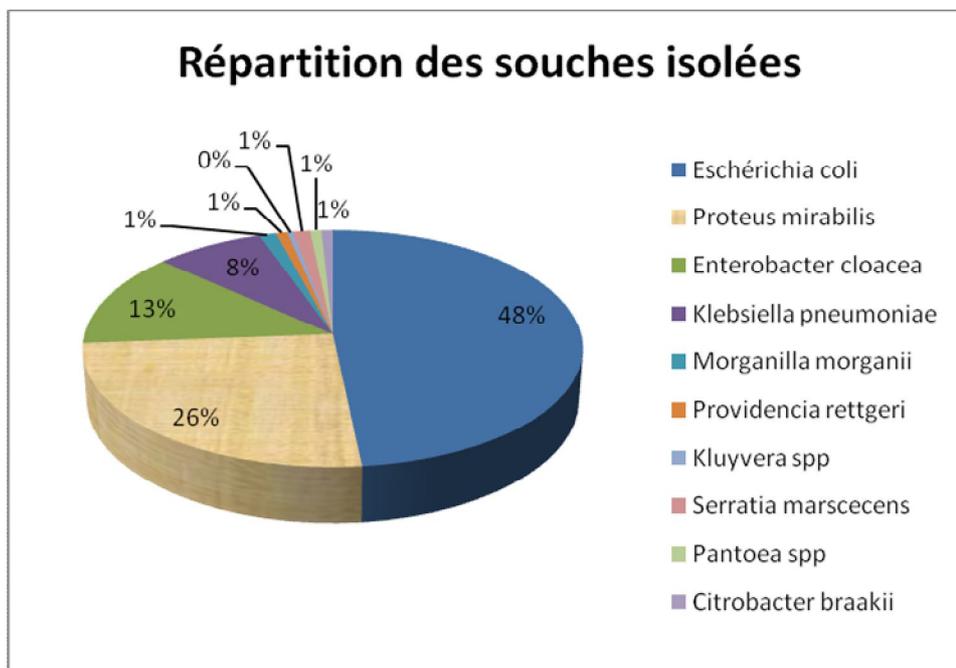


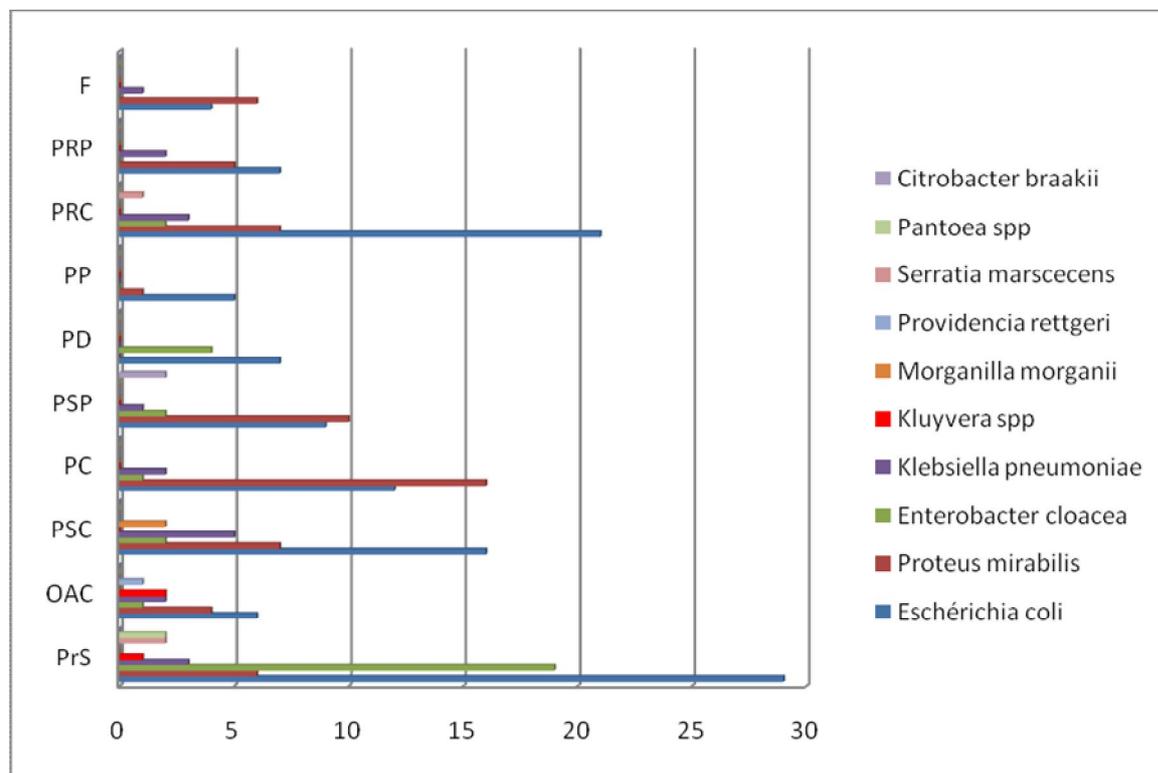
Figure 11 : Répartition des souches isolées

La répartition des souches montre qu'*Escherichia coli* constitue l'espèce la plus isolée (48,33%) suivi de *Proteus* (25,41%) et d'*entérobacter spp* (12,91%), les autres espèces étant moins représentées. Ces résultats sont similaires par ceux signalés par le réseau OMS Algérien, dans son 5^{ème} rapport d'évaluation de la résistance, 41% pour *E. coli*, et 7% pour *Klebsiella spp*.

2.2. Répartition des souches en fonction des prélèvements :

La figure suivante récapitule la répartition des souches isolées selon la nature des prélèvements effectués durant cette étude.

Figure 12 : Répartition des souches en fonction des prélèvements.



F : fientes, PRP : poulette repro-ponte, PRC : poulette repro-chair, PP : poule pondeuse, PD : poulette démarrée, PSP : poussin ponte, PC : poulet de chair, PSC : poussin de chair, OAC : œufs à couvrir, PrS : prélèvement de surface.

Les résultats montrent clairement l'absence de contamination salmonellique, lors des prélèvements de surfaces effectués durant cette étude (0 %); et cela peut s'expliquer par la bonne santé de la bande précédente. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Kechih (2009), qui ont également révélé un taux d'infection nul concernant les prélèvements de surface par les salmonelles.

En revanche, les prélèvements de surfaces ayant été contaminés par *E. coli* qui ont été de l'ordre de 80 %, cette dernière, représente une source majeure de contamination pour les futurs occupants des bâtiments d'élevage. Ce constat évoque clairement le non respect de protocole de désinfection vis-à-vis de ce germe, dans les centres avicoles étudiés.

Les *Escherichia coli* sont très facilement véhiculées par la poussière qui constitue une source importante de contamination en élevage (Oyetunde, 1978). Ainsi, il a été démontré que la poussière présente dans les élevages pouvaient contenir jusqu'à 10^6 colibacilles par gramme (Gross, 1994).

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

L'analyse des résultats révèle un taux important de contamination des œufs à couver par *E. coli*. La transmission des souches pathogènes, via l'œuf, étant très fréquente est responsable d'un taux important de mortalité chez le jeune poussin. La source majeure d'infection de l'œuf semble être la contamination fécale de sa surface, lors de la ponte, suivi d'une transmission rapide de la souche pathogène à l'ensemble du lot après l'éclosion (Gross, 1994; Jordan et Pattison, 1996 ; Dho- Moulin et Fairbrother, 1999).

D'après ces résultats, la transmission verticale des colibacilles dans le groupe « chair » peut être suspectée. On peut penser que les élevages de reproducteurs, voire de sélection, sont contaminés par ces souches de colibacilles qui se transmettent à leur descendance. (Robineau, 2010).

En effet, *E. coli* est rarement un agent d'infection primaire, il s'agit plutôt selon Borne (1998) et Donval (2006) d'une bactérie opportuniste, évoluant dans un terrain prédisposé et, devant l'expression de son pouvoir pathogène, a des facteurs déclenchant qui peuvent être d'ordre viral, bactérien ou simplement de stress.

2.3. Répartition des souches en fonction de la région :

Le tableau suivant représente la répartition des principales souches isolées en fonction de six régions.

Tableau 6 : Répartitions des principales souches en fonction de la région.

	Mostaganem	Mascara	Tiaret	Relizane	Chlef	Tissemsilt	Total
<i>Eschérichia coli</i>	65	32	11	04	04	00	116
<i>Proteus mirabilis</i>	36	06	13	03	01	02	61
<i>Enterobacter cloacea</i>	10	17	01	01	01	01	31
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	06	01	01	01	00	19
Total	121	61	26	09	07	03	227
Pourcentage	50,41	25,41	10,83	3,75	2,91	1,25	94,58

Le nombre de souches isolées, toutes espèces confondues, est prédominant pour la région de Mostaganem suivi de Mascara et enfin de Tiaret. Nous pouvons émettre, en tant qu'hypothèse, que cette prédominance est due au nombre élevé des prélèvements au niveau des régions étudiées.

3. Antibiogramme

La résistance et la sensibilité de l'ensemble des souches des entérobactéries isolées ont été testées vis-à-vis des 13 antibiotiques énumérés dans le chapitre matériels et méthodes.

Un exemple d'antibiogramme est repris dans la figure suivante.

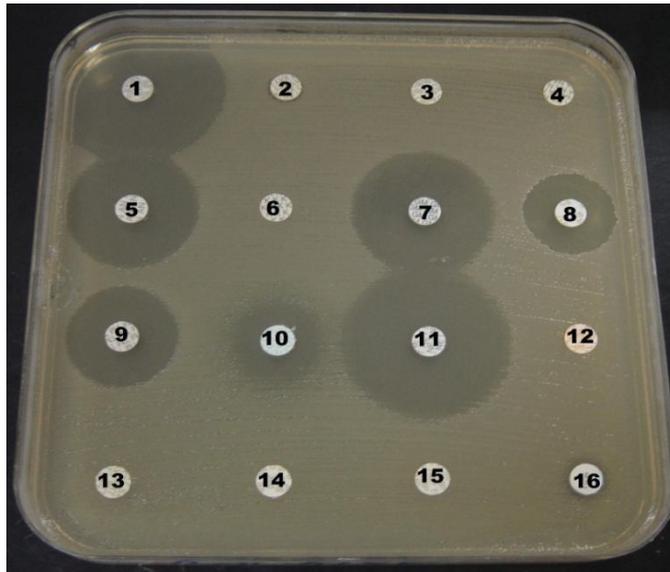


Figure 13 : Résultats de l'antibiogramme d'une souche *E. coli* vis-à-vis de 16 antibiotiques avec une résistance aux 9 antibiotiques (une résistance est remarquée au niveau des disques 2, 3, 4, 6, 12, 13, 14, 15 et 16) les trois antibiotiques 6, 9 et 15 n'ont pas été pris en considération.

Les diamètres des zones d'inhibitions sont comparés avec ceux des souches de référence (*E. coli* ATCC 25922). (Institut Pasteur d'Alger)

3.2. Antibiorésistance des principales souches étudiées aux antibiotiques testés

Les résultats obtenus font ressortir un taux élevé de résistance des espèces d'entérobactéries isolées, parmi lesquelles on peut citer *E. coli*, *Proteus spp*, *Entérobacter spp* et *klebsiella spp*.

A. *E.coli* :

Le tableau suivant illustre le pourcentage de résistance d'*E. coli* vis-à-vis de 13 antibiotiques dans cinq régions.

Tableau 7 : Résultats de l'antibiogramme des *E. coli*.

Antibiotiques		Régions		Mostaganem		Mascara		Tiaret		Relizane		Chlef		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	NT	M %		
β-Lactamines	AMX	R+I	62	96,87	30	93,75	9	81,81	4	100	4	100	109	94,78	
		S	2	3,12	2	6,25	2	18,18	0	0	0	0	6	7,82	
	AMC	R+I	30	46,87	12	37,50	6	54,54	2	50	2	50	52	45,21	
		S	34	53,12	20	62,50	5	45,45	2	50	2	50	63	54,78	
Céphalosporines	EFT	R+I	9	14,06	2	6,25	2	18,18	0	0	1	25	14	12,17	
		S	55	85,93	30	93,75	9	81,81	4	100	3	75	101	87,82	
Quinolones	NA	R+I	60	93,75	30	93,75	11	100	4	100	4	100	109	94,78	
		S	4	6,25	2	6,25	0	0	0	0	0	0	6	7,82	
	UB	R+I	61	95,31	30	93,75	11	100	4	100	4	100	110	95,65	
		S	3	4,68	2	6,25	0	0	0	0	0	0	5	4,34	
	ENR	R+I	59	92,18	29	90,62	11	100	4	100	4	100	107	93,04	
		S	5	7,81	3	9,37	0	0	0	0	0	0	8	6,95	
Tétracyclines	TE	R+I	60	93,75	31	96,87	11	100	4	100	4	100	110	95,65	
		S	4	6,25	1	3,12	0	0	0	0	0	0	5	4,34	
Sulfamides	SXT	R+I	49	76,56	26	81,25	9	81,81	2	50	2	50	88	76,52	
		S	15	23,44	6	18,75	2	18,18	2	50	2	50	27	23,47	
Aminosides	N	R+I	22	34,37	6	18,75	5	45,45	1	25	0	0	34	29,56	
		S	42	65,62	26	81,25	6	54,54	3	75	4	100	81	70,43	
	CN	R+I	7	10,93	0	0	2	18,18	0	0	0	0	9	7,82	
		S	57	89,06	32	100	9	81,81	4	100	4	100	106	92,17	
Polypeptides	CT	R+I	11	17,18	5	15,62	3	27,27	1	25	0	0	10	8,69	
		S	53	82,81	27	84,37	8	72,72	3	75	4	100	95	82,60	
Furanes	FT	R+I	16	25,00	12	37,5	6	54,54	0	0	0	0	34	29,56	
		S	48	75	20	62,5	5	45,45	4	100	4	100	81	70,43	
Phénicolés	C	R+I	13	20,31	5	15,62	4	36,36	2	50	1	25	25	21,73	
		S	51	79,68	27	84,37	7	63,63	2	50	3	75	90	78,26	

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline+acide clavulanique, EFT : Cefotiofur, NA : Acide nalidixique, UB : Fluméquine, ENR : Enrofloxacin, TE : Tétracycline, SXT : Triméthoprim+Sulfaméthoxazole, N : Neomycine, CN : Gentamycine, CT : Colistine, FT : Nitrofurantoin, C : Chloramphénicol, NT : nombre total, M % : moyenne de pourcentage.

β-lactamines :

Nos résultats mettent en évidence une forte résistance des *E. coli* isolées à l'amoxicilline dont le taux s'élève à 94,78%. Ces résultats sont largement supérieurs à ceux rapportés par Hammoudi et Aggad (2008) qui révèlent un taux de résistance à l'amoxicilline de 47 %. Ce résultat est en relation avec une utilisation accrue de cet antibiotique à des fins thérapeutiques, surtout dans les élevages avicoles dès les 1^{ers} jours de vie des sujets.

Les taux de résistance que nous avons relevés se rapprochent de ceux rapportés par Kechih en 2004 (84%) ainsi que par le réseau OMS algérien, dans son 6^{ème} rapport d'évaluation de la résistance, pour la même année, (81,4 %).

Concernant l'amoxicilline+acide clavulanique, le pourcentage de résistance est de 45,21 %. Il est inférieur à celui signalé par le réseau OMS Algérien (61,53%), dans son 10^{ème} rapport d'évaluation de la résistance aux antibiotiques. Cela est probablement dû à la faible utilisation de cet antibiotique dans les régions étudiées.

Céphalosporines

Le taux de résistance au ceftiofur est de 12,17%, celui s'avère relativement faible, sans doute en raison de l'introduction très récente de cette molécule dans les antibiothérapies appliquées aux élevages dans les régions étudiées. Le 6^{ème} rapport du réseau OMS algérien de l'antibiorésistance rapportait, quant à lui, un taux de sensibilité de 100% des *E. coli* vis-à-vis de cet antibiotique en Algérie. En revanche, le PICRA canadien rapporte un taux de résistance des colibacilles de 21% en relation avec une utilisation plus large et plus ancienne des céphalosporines dans ce pays.

Quinolones :

Nos résultats ont révélé des taux de résistance importants pour les trois antibiotiques testés de cette famille. Des taux de 94,78%, 95,65%, 93,04% ont été respectivement notés, pour l'acide nalidixique, la fluméquine et l'enrofloxacin. Cette résistance multiple est essentiellement due au fait que les quinolones partagent un seul et même mécanisme d'action, et par conséquent la résistance acquise vis-à-vis de l'une, confère automatiquement la résistance aux autres membres de cette famille d'antibiotique.

En 2008, Hammoudi et Aggad rapportèrent un taux de résistance de 31% pour la fluméquine et l'acide nalidixique, et 6% pour l'enrofloxacin, bien en dessous de celui de notre étude. Alors que Saberfar et al, (2008) dans une étude réalisée entre 2005 et 2006, signalèrent des taux de 87% pour la fluméquine et 76% pour l'enrofloxacin.

Depuis l'introduction des quinolones en médecine vétérinaire durant les années 80, par les molécules de première et deuxième génération (acide nalidixique et fluméquine) puis celles de troisième génération, les fluoroquinolones (enrofloxacin notamment), leur utilisation a connu un essor grandissant grâce à leur large spectre d'activité qui s'est élargi d'une génération à l'autre (**The MERK Veterinary Manual,1991**). Malheureusement, en l'espace de

dix ans, l'émergence des résistances chez toutes les espèces bactériennes a été observée (E.M.E.A). En Espagne, dans une étude menée sur des *E. coli* aviaires, Blanco et al en 1997, indiquèrent un taux de résistance aux fluoroquinolones déjà supérieur à 10%.

Tétracyclines :

La résistance à cet antibiotique occupe la première place du palmarès avec un taux de 95,65 %. Ce résultat est analogue à ceux rapportés par différentes études, à savoir : Hammoudi et Aggad, en 2008, 82 % ; Aggad et al, (2010) :87 %, et enfin, saberfar et al, en 2008, 96%.

Cette résistance est loin d'être récente, en 1948, toutes les souches étaient sensibles aux cyclines ; mais en moins de 10 ans, cette résistance a évolué. Entre 1956-1957, 9% des souches étaient devenues résistantes aux tétracyclines, pour atteindre 29% en 1959-1960 et celle-ci n'a cessé de croître pour atteindre 94% dans les élevages aviaires en 1999 (Blanco et al, en 1999). La persistance et l'augmentation croissante de cette résistance ont été imputées, en partie, à l'usage intempestif de cette famille d'antibiotique à large spectre, mais également, à son utilisation quasi-systématique comme promoteur de croissance dans l'alimentation des animaux destinés à la consommation humaine, cette dernière possibilité était évoquée comme cause probable de l'apparition de ces souches résistantes déjà en 1963.

Sulfamides :

Un taux important de résistance a été enregistré durant cette étude (76,52%), ce qui concorde avec les résultats obtenus par : Aggad et al, en 2010 (70 %) et Salehi et al, en 2006 (80 %). Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Hammoudi et Aggad, en 2008 (42%), ceux de Filali et al en 1988 (8 %) et, enfin ceux retrouvés dans l'enquête de Amara et al en 1994 (61%). Le taux élevé enregistré dans notre étude serait probablement la conséquence de la très grande prescription de cet antibiotique utilisé actuellement notamment dans la prévention des salmonelloses.

Aminosides :

Le pourcentage de résistance à la néomycine est de 29,56%. En 2004, le 6^{ème} rapport du réseau OMS algérien de l'antibiorésistance rapportait un taux de 35% alors que Belkader et Bellachie en 1999, signalaient un taux de 13%, similaire à celui rapporté par Blanco et al, en 1999, 14%. Par contre, Kechih, en 2004, ne rapporte qu'un taux de 4%, donc largement inférieur à celui enregistré lors de notre étude. Cette progression serait probablement due à la

large utilisation de cette molécule dans les régions étudiées. Néanmoins, Saberfar en 2008 a rapporté un taux de résistance de 87 %.

Concernant la gentamycine, le taux de résistance est de 7,82 %. Il est à peu près similaire à celui signalé par Saberfar et al, en 2008 dans l'Iran (12 %) et supérieur à celui obtenu par Aggad et al, en 2010 (3 %).

Polypeptides :

Le taux de résistance enregistré vis-à-vis de la colistine est de 8,69%. Ce taux est largement inférieur à celui rapporté par Saberfar en 2008 ($\geq 99\%$) et par Aggad et al, 2010 (13 %) et supérieur à celui signalé par Hammoudi et Aggad, en 2008 (3 %).

Furanes et Phénicolés :

Nous constatons que le pourcentage de résistance des souches *E. coli* au nitrofurantoin et au chloramphénicol, de la région de Tiaret (54,54 % et 36,36 % respectivement), est plus élevé par rapport à ceux de la région de Mostaganem (25 % et 20,31% respectivement) et Mascara (37,5% et 15,62 % respectivement), cela peut s'expliquer par l'utilisation et la vente non réglementaire de ces produits. Le nombre inégal d'échantillon pourrait également jouer un rôle dans cette différence de taux.

B. *Proteus* :**Tableau 8** : Résultats de l'antibiogramme des *Proteus Spp.*

Antibiotiques			Régions		Mostaganem		Mascara		Tiaret		Relizane		Chlef		Total	
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	NT	M %		
B-Lactamines	AMX	R+I	30	83,33	6	100	/	/	/	/	/	/	/	/	36	85,71
		S	6	16,66	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	6	14,28
	AMC	R+I	8	22,22	2	33,33	/	/	/	/	/	/	/	/	10	23,80
		S	28	77,77	4	66,66	/	/	/	/	/	/	/	/	32	76,19
Cephalosporines	EFT	R+I	10	27,77	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	10	23,80
		S	26	72,22	6	100	/	/	/	/	/	/	/	/	32	76,19
Quinolones	NA	R+I	32	88,88	5	83,33	/	/	/	/	/	/	/	/	37	88,09
		S	4	11,11	1	16,66	/	/	/	/	/	/	/	/	5	11,90
	UB	R+I	31	86,11	5	83,33	/	/	/	/	/	/	/	/	36	85,71
		S	5	13,88	1	16,66	/	/	/	/	/	/	/	/	6	14,28
	ENR	R+I	30	83,33	5	83,33	/	/	/	/	/	/	/	/	35	83,33
		S	6	16,66	1	16,66	/	/	/	/	/	/	/	/	7	16,66
Tétracyclines	TE	R+I	36	100	5	83,33	/	/	/	/	/	/	/	/	41	97,61
		S	0	0	1	16,66	/	/	/	/	/	/	/	/	1	2,38
Sulfamides	SXT	R+I	28	77,77	4	66,66	/	/	/	/	/	/	/	/	32	76,19
		S	8	22,22	2	33,33	/	/	/	/	/	/	/	/	10	23,80
Aminosides	N	R+I	18	50	2	33,33	/	/	/	/	/	/	/	/	20	47,61
		S	18	50	4	66,66	/	/	/	/	/	/	/	/	22	52,38
	CN	R+I	6	16,66	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	6	14,28
		S	30	83,33	6	100	/	/	/	/	/	/	/	/	36	85,71
Polypeptides	CT	R+I	31	86,11	3	50	/	/	/	/	/	/	/	/	34	80,95
		S	5	13,88	3	50	/	/	/	/	/	/	/	/	8	19,04
Furanes	FT	R+I	35	97,22	5	83,33	/	/	/	/	/	/	/	/	40	95,23
		S	1	2,77	1	16,66	/	/	/	/	/	/	/	/	2	4,76
Phénicolés	C	R+I	17	47,22	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	17	40,47
		S	19	52,77	6	100	/	/	/	/	/	/	/	/	25	59,52

En tête des résistances, se démarque les tétracyclines (97,61%) suivie par les nitrofurantoinés (95,23%), les quinolones (NA : 88,09%, UB : 85,71%, et ENR : 83,33%), l'amoxicilline (85,71 %), colistine (80,95%) et les sulfamides (76,19 %).

Les taux très élevés de la résistance des souches de *proteus* aux nitrofurantoinés et à la colistine est éventuellement due à la résistance naturelle.

Le taux de résistance est moyen pour la néomycine (47,61 %) et pour le chloramphénicol (40,47 %).

Des taux nettement inférieurs ont été enregistrés pour l'amoxicilline+acide clavulanique : 23,80% et le ceftiofur (23,80%). Pour la gentamycine, la résistance a été très faible (CN : 14,28%).

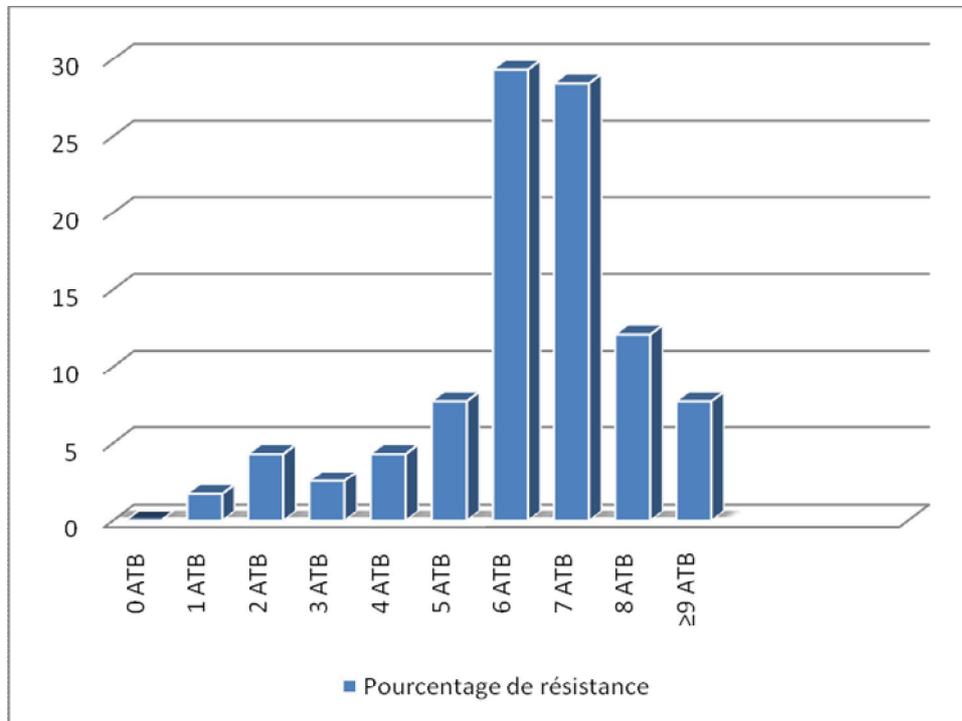
C. *Enterobacter Spp* et *Klebsiella Spp* :

En effet les résultats des antibiogrammes des *Entérobacter Spp* et *Klebsiella Spp* isolées ont démontré qu'elles sont fortement résistantes à trois familles d'antibiotiques, en l'occurrence, l'amoxicilline (92.31% et 100 % respectivement), les quinolones (NA : 76.92% et 93.75 % respectivement ; UB : 84.61% et 93.75 % respectivement ; ENR : 65.38% et 93.75 % respectivement), les tétracyclines (TE= 76.92% et 87.5 % respectivement). Pour l'AMC, nous avons noté 46.15 % et 56.25 % pour *Entérobacter Spp* et *Klebsiella Spp* respectivement. Pour les sulfamides, des taux de 53.84% et 56.25% ont été enregistrés, respectivement, pour *Entérobacter Spp* et *Klebsiella Spp*.

Des taux de résistance remarquables ont été enregistrés pour les deux souches *Entérobacter Spp* et *Klebsiella Spp* vis-à-vis de la nitrofurantoïne (26,92% et 31,25% respectivement) et du chloramphénicol (7,69% et 43,75% respectivement). Cela peut s'expliquer par l'usage de ces molécules interdites dans certaines pathologies telles que les Colibacillooses aviaires.

3.3. Pourcentage de la multirésistance :

Figure 14 : Pourcentage de la multirésistance d'*E. coli*.



Les résultats nous montrent que 100% des isolats d'*E. coli* sont résistants pour au moins 1 antibiotique, 96,51% pour au moins 2 antibiotiques, 92,20% pour au moins 3 antibiotiques, 89,62% pour au moins 4 antibiotiques, 85,31% pour au moins 5 antibiotiques, 77,56% pour au moins 6 antibiotiques, 48,25% pour au moins 7 antibiotiques, 19,81% pour au moins 8 antibiotiques et finalement 7,75% des isolats sont résistants pour 9 ou 10 antibiotiques.

Ces taux sont plus importants par rapport à ceux obtenus par Aggad et al, en 2010, qui sont de 89 % et 4 % pour au moins 2 et 5 antibiotiques respectivement, et par rapport à ceux obtenus par Hammoudi et Aggad, en 2008, qui sont de : 92, 67, 22 et 10 % pour 2, 3, 4 et 5 antibiotiques respectivement.

4. Biologie moléculaire

1.1. Analyse phénotypique des souches étudiées :

Les souches étudiées ont été sélectionnées sur la base de leur résistance à toutes les fluoroquinolones. La majorité des souches (9/18) a été isolées à partir de poulettes repro-ponte suivie de poulet de chair (5/18) et des prélèvements de surface (3/18). (Tableau 9).

Tableau 9 : Origine des souches d'entérobactéries étudiées.

Codes	Souches	Origine
S1	<i>E. coli</i>	Poulettes repro-ponte
S2	<i>E. coli</i>	Poussins de chair
S3	<i>E. coli</i>	Poussins de chair
S4	<i>E. coli</i>	Poulettes démarrées
S5	<i>E. coli</i>	Poussins de chair
S6	<i>Klebsiella pneumoniae ozaenae</i>	Prélèvements de surface
S7	<i>E. coli</i>	Poulets de chair
S8	<i>E. coli</i>	Prélèvements de surface
S9	<i>Providencia rettgeri</i>	Poulettes repro-ponte
S10	<i>E. coli</i>	Poulettes repro-ponte
S11	<i>E. coli</i>	Poulet de chair
S12	<i>Enterobacter cloacae</i>	Prélèvements de surface
S13	<i>E. coli</i>	Poulettes repro-ponte
S14	<i>E. coli</i>	Poulettes repro-ponte
S15	<i>E. coli</i>	Poulettes repro-ponte
S16	<i>E. coli</i>	Poulettes repro-ponte
S17	<i>E. coli</i>	Poulettes repro-ponte
S18	<i>E. coli</i>	Poulet de chair

S : souche.

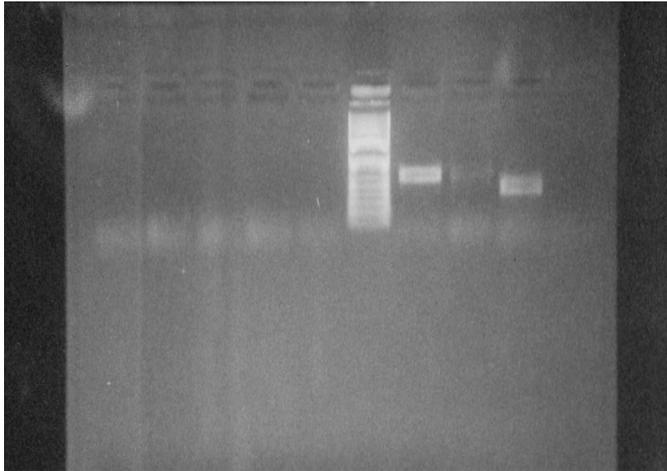
L'analyse du profil de résistance aux antibiotiques, des souches étudiées, indique que 18 souches présentent une résistance à au moins six antibiotiques (Tableau 10).

Les taux de résistance les plus élevés sont obtenus pour l'amoxicilline, suivie de triméthoprim sulfaméthoxazole, puis tétracycline, Enrofloxacin et l'acide nalidixique.

Tableau 10 : Sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées.

Codes	Souches	Qnr	Profil de résistance aux antibiotiques
S1	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, AMP,
S2	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, N
S3	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, AMP, SXT, TE,
S4	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, TE, SXT.
S5	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, TE, SXT, N.
S6	Klebsiella pneumoniae ozaenae	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, AMP, F, C, CN,
S7	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, AMP, N, F, C.
S8	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, AMP.
S9	Providencia rettgeri	/	NAL, UB, ENR, SXT, TE, AMP, AMC, CN, F, C, CT,N
S10	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, N, F.
S11	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE AMP, N, CN, F.
S12	Enterobacter cloacae	/	NAL, UB, TE, AML, AMP, AMC, F.
S13	E. coli	/	NAL, UB, AML, AMC, AMP, SXT, TE, EFT, CL.
S14	E. coli	/	NAL, UB, AML, AMP, AMC, SXT, TE, EFT, CL.
S15	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, CN, C, F.
S16	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, N, F, EFT, AMP.
S17	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, N, F.
S18	E. coli	/	NAL, UB, ENR, AML, SXT, TE, AMP, N, F, C,

S1 S2 S3 S4 S5 M1 qnrAqnrBqnrS



M1 : marqueur de taille1, S1=S2=S3=S4=S5= E. coli.

Figure 15 : Photo de la PCR multiplex.

Notre étude n'a pas permis d'identifier les souches portant le gène Qnr, alors que Honoré et al, en 2006, rapporte que la prévalence des souches Qnr-positives a été globalement de 5/737 (0,7 %), 5/282 (1,8 %) parmi les souches productrices de BLSE et de 0 % chez les souches résistantes aux quinolones non-BLSE. Cela peut s'expliquer par l'absence de la production des BLSE de nos souches.

Deux études, menées par Kehrenberg, et al en 2006, ainsi que Veldman, et al en 2008, font apparaître la présence de peptide Qnr au sein d'une souche de salmonella enterica sérovar infantis isolée en Allemagne, et dans une souche d'enterica sérovar bredeney isolée à partir de viande blanche in Holland.

Bien que la recherche des gènes Qnr soit souvent effectuée chez les entérobactéries productrices de β -lactamases, certaines études, dirigées par Mammeri H, et al. en 2005 et Wang, et al. en 2003, rapportaient la présence de ces gènes chez des souches non BLSE et chez des souches résistantes à l'acide nalidixique et/ou fluoroquinolones, avec ou sans production de BLSE.

Quoique la technique de PCR multiplex, utilisée dans cette étude, a permis d'identifier les gènes QnrA, B et S ; elle reste néanmoins limitée. En effet, les primers utilisés ne permettent pas de cribler la totalité des variants Qnr décrit jusqu'à présent. De même, d'autres gènes de résistance plasmidique aux quinolones ont récemment été découverts, connus sous les noms Qnr C et Qnr D et non amplifiables par ces primers (Wang, et al.2009 ; Cavaco, et al. 2009).

En fin, le nombre limité des souches testées peut jouer un rôle dans la significativité des résultats.

CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent qu'*E. coli* représente l'espèce la plus isolée parmi les entérobactéries dans l'espèce aviaire dont le pourcentage est de 48,33%.

La quasi-totalité des isolats testés sont résistants aux tétracyclines avec un taux de 95,65% car c'est une molécule utilisée depuis fort longtemps en thérapie.

Les taux de résistances sont aussi importants pour l'amoxicilline (94,78) et les quinolones (acide nalidixique : 94,78%, flumequine : 95,65% et l'enrofloxacin : 93,04%). Ce sont des produits très disponibles sur le marché algérien avec des prix abordables.

Les pourcentages de la résistance aux molécules interdites dans le domaine vétérinaire sont alarmants pour la nitrofurantoïne (29,56%), le chloramphénicol (21,73%) cela est peut être due à l'utilisation non réglementaire de ces antibiotiques dans les régions étudiées.

Notre étude a permis de révéler un taux très élevé concernant la résistance individuelle d'*E. coli* (100% des isolats sont résistants à au moins un antibiotique) ainsi que pour la multirésistance (96,51% et 92,20% des isolats résistants pour au moins 2 et 3 antibiotiques différents respectivement) pour les isolats analysés.

Les taux de la résistance sont aussi remarquables pour les autres espèces des entérobactéries.

La recherche des gènes *Qnr*, responsables de la résistance plasmidique aux quinolones, par la méthode de PCR multiplex ne permet pas de révéler la présence de ce gène dans nos souches.

Au terme de cette étude appelée certes à être affinée, il apparaît clairement le développement croissant des résistances aux différentes classes d'antibiotiques utilisées sur le terrain essentiellement en raison d'un usage intempestif et souvent irraisonné de ces molécules exerçant ainsi une pression élevée de sélection de souches résistantes.

Cette résistance implique une utilisation plus rationnelle des antibiotiques dans le domaine vétérinaire

Enfin la surveillance ne peut pas reposer sur l'antibiogramme mais sur la surveillance génétique des souches multirésistantes.

RECOMMANDATIONS

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

Face à l'émergence et la persistance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, il convient de formuler quelques recommandations :

1. La mise en œuvre d'une antibiothérapie réfléchie et raisonnée tenant compte des profils de résistances des bactéries isolées.
2. L'organisation de l'utilisation anarchique des antibiotiques chez les animaux en rendant leur prescription obligatoire par le vétérinaire.
3. La surveillance plus étroite que jamais des résistances et des souches circulantes nous paraît évidente mais nécessiterait le développement d'outils de laboratoire performants et accessibles.
4. Un choix plus judicieux des désinfectants utilisés et adaptés au germes en présence s'impose tout naturellement au regard des taux de contamination des surfaces par *E. coli*.

1. Aggad, H., Ahmed Ammar, Y., Hammoudi, A and Kihal, M. 2010. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis. *Global Veterinaria* 4 (3): 303-306.
2. Amara, A., Ziani, Z., Bouzoubaa, K. 1995. Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Vet microbiology*. 43, 325-330.
3. Andremont, A. 2002. pression de sélection antibiotique, flores commensales et évolution de la résistance. *J Pédiatr Puériculture* ; 15 : 160-5.
4. Arne, P., Marc, D., Bree, A., Schouler, C., Dhomoulin, M. 2000. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion. *Avian Dis.* **44**, 343-355.
5. Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. 2000. Bactériologie clinique, 2^{ème} édition. Edition Ellipses., Paris: 171-177.
6. Avril, J.L, Eaucher, J.L. 2002. Bactériologie Générale et Médicale. Edition Ellipses Marketing, S A : 242-248.
7. Babai, R., Blum-Oehler, G., Stern, B.E., Hacker, J., Ron, E.Z. 1997. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.*: **149**, 99-105.
8. François, Denis., Marie-Cécile, Ploy., Christian, Martin., Edouard, Bingen., Roland, Quentin., 2007. Bactériologie médicale. Techniques usuelles : 295-321.
9. Baiod, N. 1996-1997. Prévalence, résistance aux antibiotiques et virulence des salmonelles mineures isolées dans les hôpitaux de la région d'Alger : étude sur 106 souches. Thèse de magistère ; Option : Microbiologie, 16-18 ; 20-27, 38-41,79-83.
10. Bastianelli, D., Lebas, C. 2000. Evaluation du rôle de l'alimentation animale dans la sécurité des aliments : perspectives d'actions.
11. Bébéar, C., Allery, A., Bébéar, CM., B, de Barbeyrac. 1998. Biologie moléculaire et bactériologie. *Immunoanal Biol Spéc.* Elsevier, Paris; 13 : 273-278.
12. Bell, C et Kyriakides, A. 2002. Salmonella in: Foodborne Pathogens. Hasards, risk analysis and control. Woodhead Publishing Limited.: 307-334.
13. Belkader, C., Bellache, S. 1999. les colibacillooses aviaires en Algérie. Mémoire de Fin d'étude. ISN, USTHB.
14. Beraud, J., 2001. Le Technicien d'Analyses Biologiques. Edition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris : 961-996.

15. Bertrand, S., Boyen, F., Buck, J. et Collard, M. 2005. Salmonella dans les viandes de volaille et dans les œufs : Un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann. Méd. Vét.*, Vol :149, 34-48.
16. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J. 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by VT strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2953-2957.
17. Bories, M.G. et Louisot, P. 1998. Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale.
18. Borne, P.M. 1998. Les colibacilloses avicoles: des bactéries toujours à l'affût. *Afrique Agriculture.*, 83.
19. Bossie, S., Buchmeier, J., Chen, C.Y., Fang, C., Guiney, D.G., Libby, S.J., SLY, A. 1997. A transcriptional regulator of Salmonella Typhimurium is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophage. *Infect. Immun.*, Vol: 65, 3725-3730.
20. Bouthy, H. et al. 1988. Diagnostic sérologique de l'infection à SPG. *Rec Med Vet*, 213-220.
21. Bouvet, P. 2002. Salmonelle et Salmonelloses en France. In : « Sécurité Alimentaire du Consommateur. », 2^{ème} Edition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris : 1-33.
22. Bree, A., Dho, M., Lafont, J.P. 1989. Comparative infectivity for axenic and specific pathogen free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Dis.*, **33**, 134-139.
23. Brisabois, A. 2001. Intérêt et limites des techniques de caractérisation des salmonella. *Epidémiol. Et Santé Anim.*, 31-42.
24. Cardinale, E., Perrier, J.D., Aidara, A., Tall., Coudert, C., Colin, M. 2002. Salmonella spp, AFSSA.
25. Carlier, V. et Lagrange, P. 2001. Salmonella, service d'information alimentaire, H.C.S. International. Paris. pp: 84.
26. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM (2009) qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enteric serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 53:603–608.

27. Chevalier, J., Mailea, M., Pages, J.M., 2000. Comparative aspects of the diffusion of norfloxacin, cefepime and spermine through the F porin channel of *Enterobacter cloacae*, *Biochem. J.* 348, 223-227.
28. Clinquart, A., Daube, G. et Korsak, N. 2004. Salmonella spp dans les denrées alimentaires d'origine animales, un réel problème de santé publique. *Ann. Méd. Vét.*, Vol. 148, 174-193.
29. Colin, P. 1993. Salmonella et production animale. *Méd. Mal. Infec.*, Vol 20, 466-467.
30. Devie, P., Le Goaziou, A., Divol, A., Olivon, M., Gilbert, G., Petit, J. et Laurent, S. 2006. Les antibiotiques dans l'alimentation animale, 1-30.
31. Dho, M., Lafont, J.P. 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and non lethal for chicks. *Avian Dis.*, **28**, 1016-1025.
32. Dho-Moulin, M., Fairbrother, J. M. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, **30**, 299-316.
33. Donval, J.C. 2006. Les infections à *Escherichia coli* chez les poules pondeuses. *Filières Avicoles*, 120-123.
34. Dozois, C.M., Chanteloup, N., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., Fairbrother, J.M. 1994. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, **38**, 231-239.
35. Dozois, C.M., Fairbrother, J.M., Harel, J., Bosse, M. 1992. Pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.*, **60**, 2648-56.
36. Dozois, C.M., Pourbakhsh, S.A., Fairbrother, J.M. 1995. Expression of P and type 1 (F1) *fimbriae* in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Microbiol.*, **45**, 297-309.
37. Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtis, III. R. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infect. Immun.*, **68**, 4145-4154.
38. Drobni, M., Bonnedahl, J.H., Haemig., Olsen, B. 2009. Vancomycin-resistant *Enterococci*, point barrow, Alaska, USA. *Emerg Infect Dis* 15:838-9.
39. Dufay, A.C. 1999. Un vaccin contre la transmission de la colibacillose aux poussins. *Filières Avicoles*, 19.

40. Ellis, M.G., Arp, L.H., Lamont, S.J. 1988. Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 2034-2037.
41. Elfadil, A.A., Vaillancourt, J.P., Meek, A.H., Julian, R.J., Gyles, C.L., 1996. Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. *Avian Dis.*, **40**, 690-698.
42. Emery, d.A., Nagaraja, K.V., Shawd, P., Newman, J.A., White, D.G. 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis*, **36**, 504-511.
43. Euzeby, J.P. 1997. Les salmonelles et les salmonelloses aviaires dues aux sérovars ubiquistes. *Revue Méd. Vét*, 61-76.
44. Fang, F.G. et Vasquez-Torre, A. 2001. Salmonella evasion of NADH phagocyte oxydase. *Micro. Infec.*, Vol. 3, 1313-1320.
45. Filali, E., Bell, J.G., El Houadfi, M., Huggins, M.B., Cook, J.K. 1988. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Morocco. *Comp Immunol Microbial Infect Dis.* 11.
46. Flandrois, J.P., 1997. Bactériologie Médicale. Presse universitaire de Lyon, 181-187.
47. Fort, Dodge. 1999. Sante Animale. Gumboro : un vaccin administrable dans les œufs à couver, Filières Avicoles N°615, 18.
48. Fosse, J., Magras, C. 2004. *Salmonella enterica enterica* ; in : « Danger Biologique et Consommation des viandes », Technique et documentation, Lavoisier, Paris, 147-152.
49. François, Denis., Marie-Cécile, Ploy., Christian, Martin., Edouard, Bingen., Roland, Quentin. 2007. Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles. Elsevier Masson SAS, Paris.
50. François-Xavier, Weil. 2009. *Salmonella* : épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques, *Revue francophone des laboratoires*, supplement Au N°409.
51. Garre, M., Penneq, Y. 2003. Salmonelloses de l'adulte. *Encyclo. Méd. Chir. Edition Scientifique et Médicale*, Elsevier SAS, Paris, Maladies Infectieuses, 9.
52. Gast, R.K., Beard, C.W. 1990. Production of *Salmonella* Enteritidis- contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis*, 438-446.
53. Glunder, G. 1990. Dermatitis in broilers caused by *Escherichia coli*: isolation of *Escherichia coli* from field cases, reproduction of the disease with *Escherichia coli* O78:K80 and conclusions under consideration of predisposing factors. *J. Vet. Med.* [B], **37**, 383-391.

54. Gibbs, P.S., Maurer, J.J., Nolan, L.K., Wooley, R.E. 2003. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complements resistance, Colicin V production, and presence of the increased serum survival gene cluster (iss). Avian Dis. 47(2): 370–379.
55. Gibbs, P.S. & Wooley, R.E. 2003. Comparison of the intravenous chicken challenge method with the embryo lethality assay for studies in avian colibacillosis. Avian Dis. 672–680.
56. Gorden, R.F. 1979. Pathologies des volailles, Maloine S.A. Editeur, , 21-36.
57. Gow, S. 2005. La résistance antimicrobienne, l'usage judicieux des agents antimicrobiens (PICRA). La médecine vétérinaire des grands animaux. Ronde clinique. 7,1-6.
58. Gradel, K.O., Rattenborg, E. 2003. A questionnaire-based retrospective field study of persistence of Salmonella Typhimurium in Danish broiler houses. Prev. Vet. Med, 56, 267-284.
59. Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007. *Salmonella*, in : Freney J., Renaud F., Leclercq R., Riegel P. (Eds.), Précis de bactériologie clinique, 2e édition, Eska Paris, 1051-1072.
60. Gross, W.G. 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: GYLES C.L. (Eds), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab international: Wallingford, 237-259.
61. Honoré, S., Lascols, C., Malin, D., Targaouchi, R., Cattoir, V., Legrand, P., Soussy, C-J., Cambau, E. 2006. Émergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital Henri-Mondor 2002–2005). Pathologie Biologie 54, 270–279.
62. Hooper, D.C. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis :7, 337–41.
63. Humbert, F. 1998. Les salmonelles in Manuel de Bactériologie Alimentaire, 28-44.
64. Hammoudi, A., Aggad, H. 2008. Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria. Turkish J. Veterinary and Animal Sci. 32(2): 123-126.
65. Ike, K., Kawahara, K., Danbara, H., Kume, K. 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. J. Vet. Med. Sci., 54, 1091-1098.

66. Jacoby, G.A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*; 41 Suppl 2:S120-6.
67. Jean-Louis, Koeck., Mohammed, Chakour., Rémy, Teyssou. 2001. Apport de la biologie moléculaire au diagnostic bactériologique. *Revue Française des Laboratoires*, septembre, N ° 335.
68. Jean-Marie, Pagès., Eric, Garnotel. 2003. Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à gram négatif. *Revue Française des Laboratoires.*, N° 352.
69. Jean-Philippe, Lavigne., Albert, Sotto., Corinne, Merle., Jacques, Jourdan., Claude-James, Soussy., Danielle, Sirot. 2002. Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêtalactamines et prévalence en clinique. *Pathol Biol*, 50 : 388-93.
70. Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K. 2008. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for use as a rapid Diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (12): 3987–3996.
71. Joiner, K.A. 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev Microbiol.*, 201-230.
72. Jordan, F.T.W., Pattison, M. 1996. Poultry diseases. W. B. Saunders Company: London, 38-43.
73. Kallenius, G., Mollby, R., Svenson, S.B., Helin, I., Hultberg, H., Cedergren, B., Winberg, J. 1981. Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Lancet*, 2, 1369-1372.
74. Katwa, L.C., White, A.A. 1992. Presence of fonctional receptors for the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the gastrointestinal tract of the chicken. *Infect. Immun.*, 60, 3546-3551.
75. Kechih, S. 2004. Résultats de l'étude de la résistance d'*Escherichia coli* aviaires à certains antibiotiques. In : 6eme rapport d'évaluation de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, OMS Algérie.
76. Kechih, S. 2009. prévalence et caractérisation des salmonelles chez l'espèce *gallus gallus* dans quelques wilayas du centre de l'Algérie. ; Mémoire de Magister, ENSV.
77. Kehrenberg, C., Friederichs, S., Jong, A., Michael, G.B., Schwarz, S., 2006. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar infantis. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 18–22.

78. Korsak, N., Clinquart, A. et Daube, G. 2004. Salmonella spp dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Ann. Méd. Vét.*, 174-193.
79. Lafont, J.P., Dho, M., D'hauteville, H.M., Bree, A., Sansonetti, P.J. 1987. Presence and expression of aerobactin genes in virulent strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **55**, 193-197.
80. Lamoril, J., Bogard, M., Ameziane, N., Deybach, J-C., Bouizegarène, P. 2007. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007, Immuno-analyse et biologie spécialisée 22, 5–18.
81. Leclerc, L.S., Meyer, A. 1994. Cours de Microbiologie Générale. Edition Doin, 220-240.
82. Lecoanet, J. 1992. Salmonelloses aviaires In : Brugere-Picoux J. et Silim A., Manuel de pathologie aviaire Ed. Chaire de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort, 255-35.
83. Lesbouyries, G. 1965. Pathologies des oiseaux de basse-cour. Vigot Freres editeurs, 164-212 ; 241-246.
84. Li, X.Z., Nikaido, H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*;64:159–204.
85. Malo, D. et Salaz, L. 2004. Protagoniste de l'immunité innée dans les infections à salmonella. *Médecine-Sciences*. Vol. 12, N°20, 1119-1124.
86. Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L., Nordmann, P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(1):71–6.
87. Marc, P., Arne, P., Bree, A., Dho-moulin, M. 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a fimmutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, **149**, 473-485.
88. Marcus, L.S., Brumell, G.H., Pfeifer. 2000. Salmonella pathogenicity island : Big virulence in small packages. *Med. Rev.* Vol. 2, 145-156.
89. Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*; 351:797-9.
90. McEwen. 2002. Rapport du comité consultatif sur l'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation : les conséquences pour la résistance et la santé humaine. University of Guelph. Collège de médecine vétérinaire de l'Ontario, Canada, 118-123.

91. Mellata, M., Dho-Moulinm., Dozois, C.M., Curtiss, R., Lehoux, B., Fairbrother, Jm. 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun*, 71:494-503.
92. Millemann, Yves. 1998. Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles. *Vte. Res*, 3-19.
93. Nakamura, K., Cook, J.K., Frazier, J.A., Narita, M. 1992. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 36, 881-890.
94. Nauciel, C., Vilde, J.L. 2005. Bactériologie Médicale. Edition Masson, Paris, 40-131.
95. Ons, E., Bleyen, N., Tuntufye, H.N., Vandemaele, F., Goddeeris, B.M. 2007. High prevalence iron receptor genes of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathol.* 36(5): 411–414.
96. Orskov, F., Orskov, I. 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals, *Can. J. Microbiol.* 38, 699-704.
97. Oyetunde, O.O.F., Thomson, R.G., Carlson, H.C., 1978. Aerosol exposure of ammonia, dust and *Escherichia coli* in broiler chickens. *Can. Vet. J.*, 19, 187-193.
98. Parreira, V.R., Arns, C.W., Yano, T. 1998. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. *Avian Pathol.*, 27, 148-154.
99. Pattison, M., Chettle, N., Randall, C.J., Wyeth, P.J. 1989. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Vet. Rec.*, 125, 229-231.
100. Pedrosa, A.A., 2009. Which came first: the egg or its microbial. The poultry informed professional, University of Georgia, Issue 107 July/August 2009.
101. Périchon, B., Courvalin, P., Galimand, M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(7):2464-9.
102. Périchon, B., Courvalin, P. 2009. Antibiotic Resistance. Elsevier Inc. Institut Pasteur, Paris, France
103. PICRA : Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens, 2005. 193-204.
104. Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D., Denis, F. 2005. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 20, 343–352

105. Poirel, L., Liard, A. Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P. 2005. *Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*; 56:1118-21.
106. Poirier, E., Watier, L., Espié, E., Weill, F.X., de Valk, H., Desenclos, J.C. 2007. Evaluation of the impact on human salmonellosis of control measures targeted to *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in poultry breeding using time-series analysis and intervention models in France, *Epidemiol. Infect.* 30, 1-8.
107. Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*; 10:12–26.
108. Pourbaksh, S.A., Dho-moulin, M., Bree. A., Desautels, C., Martineau-Doize, B., Fairbrother, J.M. 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 *fimbriae* in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, **22**, 331-41.
109. Poyart, C. 2003. bactériologie générale. P.C.E.M. 2. Faculté de médecine ; Necker-Enfants malades, 50 – 77 ; 375-431.
110. Provence, D.L., Curtiss, III R. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.*, **62**, 1369-1380.
111. Regnault, J.P. 2002. Elément de Microbiologie et d'Immunologie. Décarie édition Inc, Rapport légal, 3^{ème} trimestre, 885-890.
112. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*; 12:83-8.
113. Robineau Brice et Pierre-Yves Moalic, Bull. 2010. Acad. Vét. France, Tome 163 - N°3. Revue Francophone Des Laboratoires. Supplément Au N°409
114. Rodriguez-Martinez, J.M., Velasco, C., Garia, I., Cano, M.E., Martinez- Martinez, L., Pascual, A. 2007. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for Enterobacteriaceae expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother*; 51(6):2236-9.
115. Rostagno, M.H., Wesley, I., Trampel, D. et Hurd, H. 2006. Salmonella prevalence in market-age turkeys on farm and at slaughter. *Poultry science*. 85(10):1838-1842.
116. Saberfar, E., B, Pourakbari., K, Chabokdavan. and F, Taj Dolatshani. 2008. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Iranian broiler chicken, 2005-2006. *J. Appl. Poultry Res.*, 17: 302-304.

117. Salvadori, M.R., Yano, T., Carvalho, H.F., Parreirav, R., Gyles, C.L. 2001. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, **45**, 43-51.
118. Sanders, C.C. 2001. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clin Infect Dis*; 32 Suppl 1:S1-8.
119. Sojka, W.J., Carnaghan, R.B.A. 1961. *Escherichia coli* infection in poultry. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 340-353.
120. Sonaiy, EB., Swan, J. 2004. Production en aviculture familiale. Un manuel technique. Rome, 246-288.
121. Soussy, CJ. 2006. Quinolones et bactéries à Gram négatif. In: L'Antibiogramme. Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Editions ESKA, 2e édition, Paris.
122. Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS., 2008. 4^{ème} ed.
123. Stordeur, P., Mainil, J. 2002. La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.* **146**, 11-18.
124. Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., Euzéby, J. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 521-524.
125. Tran, J.H., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*; 49:118-25.
126. Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J., Tulkens, P.M. 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect*; 11(4):256-80.
127. Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Pasmans, F., Bertrand, S., Collard J.M., Saegerman, C., Hooyberghs, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2005. Salmonella dans la viande de volaille et dans les œufs un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann. Méd. Vét.*, 34-48.
128. Vandekerchove, D., De Herdt, P., Laevens, H., Pasmans, F. 2004. Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathology* 33(2): 117-125.
129. Vandekerchove, D., Vandermaele, F., Adriaensen, C., Zaleska, M., Hernalsteens, J.P., De Baets, L., Butaye, P., Van Immerseel, F., Wattiau, P., Laevens, H. 2005. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet Microbiol.* 108 (1-2): 75-87.

130. Veldman K, van Pelt W, Mevius D (2008) First report of qnr genes in Salmonella in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 61:452–453.
131. Vidotto, M.C., Cacao, J.M., Goes, C.R., Santos, D.S. 1991. Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **24**, 677-685.
132. Villate, D. 1990. Manuel pratique : Maladies des volailles, Editions France Agricoles, 3613-3620.
133. Villate, D. 1997. Manuel pratique : Maladies des volailles, Editions France Agricole, 235-240 ; 242-257.
134. Vincent, Cattoir. 2004. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* 52, 607–616.
135. Wang, M., Tran, J.H., Jacoby, G.A., Zhang, Y., Wang, F., Hooper, D.C., 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2242–2248.
136. Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D.C., Wang, M., 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*
137. White, D.G., Wilson, R.A., San Gabriel, A., Saco, M., Whittam, T.S. 1990. Genetic relationships among strains of avian *E. coli* associated with swollen head syndrome. *Infect. Immun.*, **58**, 3613-3620.
138. Williams, P.H. 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **26**, 925-932.
139. Wooley, R.E., Gibbs, P.S., Brown, T.P., Maurer, J.J. 2000. Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis.*, **44**, 318- 324.
140. Yaguchi, K., Ogitani, T., Osawa, R., Kawano, M., Kokumai, N., Kaneshige, T., Noro, T., Masubuchi, K., Shimizu, Y. 2007. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. *Avian Dis.* 51(3):656–662.
141. Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D., Ouar Korich, M.N. 2001. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 13-14.
142. Yogaratnam, V. 1995. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Vet. Rec.*, **137**, 215-217.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

I.1. Localisation des sites de l'étude

L'étude s'est déroulée au niveau du service de bactériologie médicale du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem (Ministère de l'agriculture et du développement rural) et du service de la biologie moléculaire du laboratoire de bactériologie médicale de l'Institut Pasteur d'Alger (Ministère de la santé).

I.2. Population étudiée et durée de l'expérimentation

Les prélèvements reçus au service de bactériologie médicale du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem provenaient d'élevages de reproductrices chair et ponte (fermes étatiques et privées) dans le but d'effectuer des analyses dans le cas de la suspicion de la salmonellose aviaire et parfois pour effectuer des antibiogrammes.

Notre travail a porté sur des prélèvements provenant de six régions : Mostaganem, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret et Tissemsilt durant la période s'étalant entre Avril 2010 et janvier 2011.

I.3. Nature de l'échantillon :

Quatre types de prélèvements ont été reçus au niveau du service de bactériologie médicale de laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem au cours de cette étude :

I.3.1. Prélèvements de surfaces :

Les prélèvements, par écouvillonnage, ont été effectués avant l'arrivée des poussins et pour toutes les mises en place, afin d'évaluer la qualité de la désinfection réalisée.

Trois écouvillons (sol, murs, plafonds) ont été effectués par prélèvement.

I.3.2. Sujets :

Prélèvement systématique de vingt sujets vivants par bâtiment dans le cas de poussins et cinq sujets vivants dans le cas de poulets.

I.3.3. Œufs à couvrir :

Prélèvement de trente œufs par bâtiment.

I.3.4. Fientes :

Prélevées dans des tubes stériles et acheminés le plus tôt possible au laboratoire.

I.4. Milieux de culture, produits et matériels de laboratoire :

*Gélose Hecktoen (milieu d'isolement des entérobactéries) ;

*Bromocrésol pourpre (milieu d'isolement des entérobactéries) ;

*Mac Conkey (milieu d'isolement des bactéries lactose +) ;

* Milieux : TSI (triple sugar Iron), citrate de simmons, milieu Mannitol-Mobilité, urée-indole, LDC et ADH, sont des milieux d'identification biochimique ;

*Milieu Mueller Hinton est utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme ;

*Disque d'oxydase, Arcomex ; Jordan ; utilisé pour la recherche de la production d'oxydase ;

*Réactif Kovac's ; Arcomex ; Jordan : utilisé pour la recherche de la production d'indole.

*Réactif TDA (Tryptophane Désaminase) ;

*Disques d'antibiotiques : Bio-Rad(France), Oxoid (Angleterre) ;

*Taq polymérase, Tampon de la réaction de PCR, DNTP et MgCL₂ :Promega (USA) ; utilisés pour la réaction de PCR.

*Marqueur de taille 1 KB DNA ladder : Abgene(USA) ;

*Bromure d'éthidium : Sigma (Almand);

*Bleu de bromothemol: Abgene (USA);

*Gel d'agarose : Invitrogen life technologie (France) ;

*TBE: Invitrogen life technologie (France) ;

*Bain sec: Thermoblock, SBH 200 D/3;

*Vortex: Heidolph, Top-Mix 94323, Fisher Bioblock (France);

*Distributeur des disques d'antitibiogramme ;

*Centrifugeuse réfrigérante 13×1000 Tr/m : Centrifuge 5415 R, Eppendorf ;

- *Mini-centrifugeuse : Minispin 12×1000 Tr/m, Fisher Bioblock (France) ;
- *Générateur du courant : Censort E844 ;
- *Hotte à flux laminaire : Captair biobyerlab, Dominique Dutsher (France) ;
- *Thermocycleur : GeneAmp* PCR System 9700 (Fisher Bioblock, France);
- *Transluminateur : propage des rayons ultraviolet pour mettre en évidence de l'ADN ;
- *Gelcan photo : imageur ;
- *Cuve et la peigne d'électrophorèse : Fisher Bioblock (France) ;

II. Méthodes

II.1. Diagnostic nécropsique

- Les autopsies ont été réalisées au niveau de la salle d'autopsie du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem.

A. Colibacillose

Les lésions couramment constatées sont reprises dans le tableau N°5.

B. Salmonellose

Aucune lésion pouvant faire penser à la salmonellose n'a été constatée.

II.2. Diagnostic de laboratoire :

Après l'examen externe, les sujets ont été autopsiés; et toutes les lésions observées ont été notées.

Les organes prélevés sont placés dans des boites de Pétri et acheminés au service de bactériologie médical.

Les prélèvements ont été réalisés aseptiquement et clairement identifiés. La nature des prélèvements effectués variait selon l'âge des animaux prélevés (tableau N°3).

Tableau 3 : Nature des prélèvements effectués selon l'âge de l'animal.

Age	Organes prélevés
Sujet jeune (poussin)	Sac vitellin, foie, rate et cœur.
Sujet adulte	Foie, rate et cœur.

II.2.1. Méthodes d'isolement et d'identification des entérobactéries

A. Phases d'isolement

L'isolement a été effectué selon deux méthodes :

Isolement direct : technique utilisée dans la recherche des *E. coli*, pour les prélèvements d'organes en cas de lésions septicémiques seulement ; elle est effectuée par un ensemencement direct sur des boîtes de pétri contenant de la gélose de bromocrésol pourpre (BCP), lesquelles seront incubées pendant une nuit à 37°C.

Isolement indirect : comporte quatre étapes distinctes (figure 4).

A.1. Isolement des salmonelles

La recherche des salmonelles éventuellement présentes dans les échantillons recueillis au cours de cette étude a été effectuée par les étapes suivantes.

A.1.1. Phase de pré-enrichissement

Après cautérisation de la surface, 1g de prélèvement d'organe broyé a été plongé dans 10 ml d'eau peptonnée tamponnée (EPT) et mis à incuber à 37°C pendant 18 à 20 h.

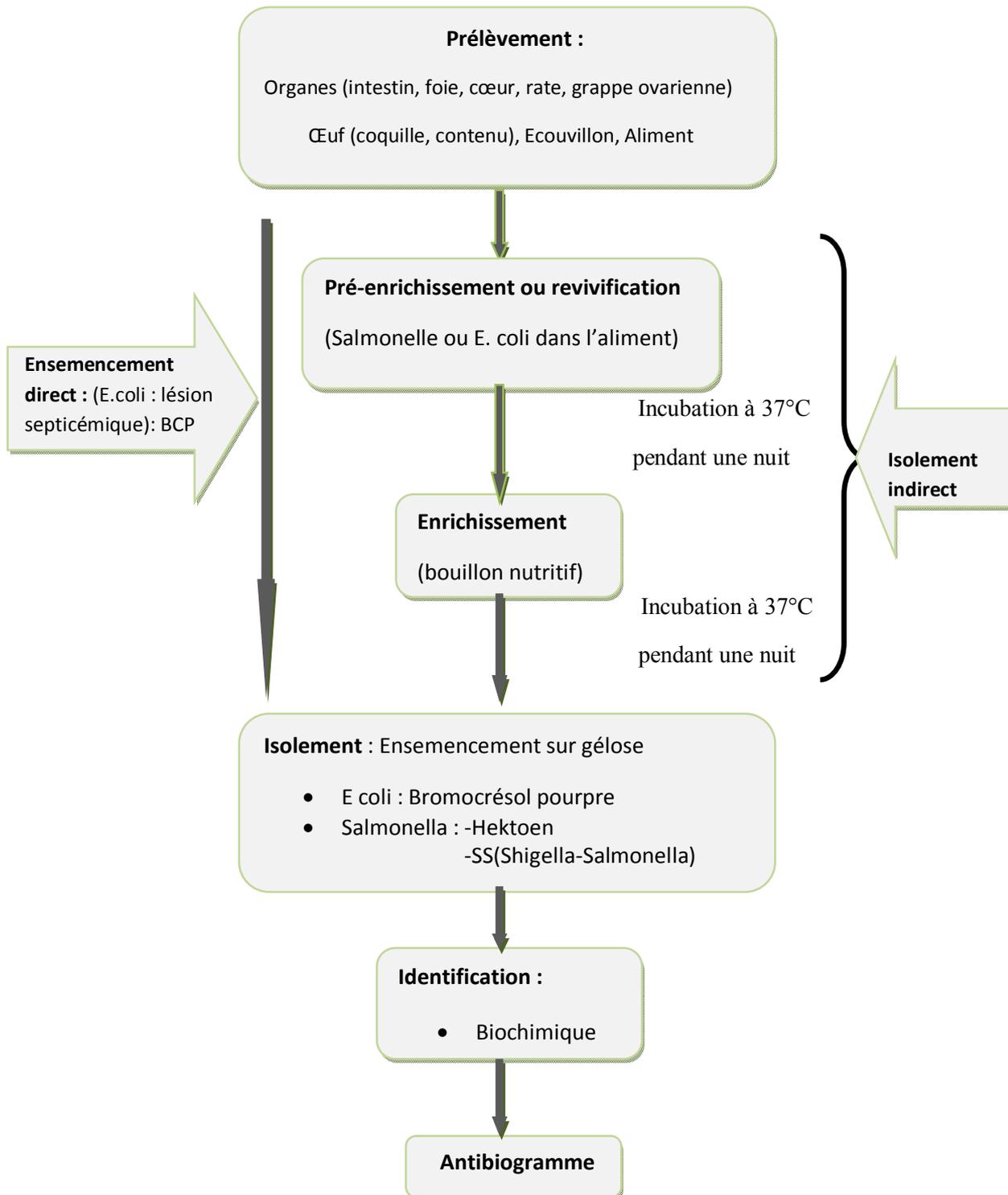
A.1.2. Phase d'enrichissement

Un ml de suspension de pré-enrichissement a été mélangé à 10 ml de bouillon au sélénite de sodium (SFB) et mis à incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

A.1.3. Phase d'isolement

Au terme de la précédente incubation, le contenu de la culture était homogénéisé et 1 ml de la suspension était ensemencée (épuisement par stries) sur une gélose Hektöen et incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Figure 4 : Protocole d'isolement et d'identification des germes (Institut Pasteur Algérie)



A.2. Isolement des autres entérobactéries :

L'isolement des entérobactéries a obéi à un protocole opératoire quasi-identique à celui des salmonelles, décrit plus haut, avec toutefois quelques modifications et adaptations qui sont énumérées ci-dessous. La procédure ne comporte plus que 3 étapes, la phase de pré-enrichissement n'étant pas nécessaire à l'isolement des autres entérobactéries (sauf dans l'aliment).

Le milieu d'isolement utilisé est le bromocrésol pourpre (BCP), et les bactériesensemencées mises à incuber à 37°C pendant 24 à 72 heures.

B. Phase d'identification

B.1. Identification morphologique

Sur le plan macroscopique : la forme et la couleur des colonies sont décrites dans les annexes 8 et 9.

Sur le plan microscopique : L'identification est basée sur l'observation microscopique de bacilles Gram- après coloration différentielle de Gram. Ces entérobactéries se présentent sous l'aspect de petits bâtonnets (2 à 3 µm par 0,6 à 0,8 µm) présentant une ciliature péritriche.

B.2. Identification biochimique

Pour identifier les entérobactéries au laboratoire on dispose de deux types de galeries.

- . La galerie d'identification des entérobactéries
- . La galerie API 20E.

- **Galerie d'identification des entérobactéries**

L'identification des entérobactéries se fait sur la base de caractères biochimiques.

Elle est composée de 5 milieux :

- . **Le milieu Kligler Hajna (KH).** Ce milieu permet la lecture de quatre caractères :
 - . Fermentation du glucose
 - . Fermentation du lactose
 - . Production d'hydrogène sulfuré

- . Production de gaz
- . **Le milieu mannitol-mobilité.** Il permet de lire :
 - . Utilisation du mannitol par le germe
 - . Mobilité
- . **Le milieu citrate de simons.** Il permet de lire l'utilisation du citrate par le germe.
- . **Le milieu urée-indole.** Il permet de lire :
 - Possession d'une uréase par le germe.
 - Possession d'une tryptophane désaminase par le germe, en présence de chlorure ferrique.
- . **Le milieu LDC :** pour la mise en évidence d'une lysine decarboxylase
- . **Le milieu ADH :** pour la mise en évidence d'une Arginine-dihydrolase
 - **Galerie API 20E**

Des systèmes API 20E ont été utilisés afin de déterminer les caractéristiques biochimiques de l'espèce bactérienne isolée. Le système API se présente sous la forme d'une bande de plastique (figures 8 et 9) avec 20 microcupules contenant des substrats déshydratés pouvant permettre la détection de certains caractères biochimiques qui sont :

- Fermentation des carbohydrates : glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amylase et arabinose ;
- Décarboxylation des acides aminés : lysine, ornithine et arginine ;
- Hydrolyse de l'urée ;
- Formation d'indole, la production d'acétone ;
- Hydrolyse de la gélatine ;
- Hydrolyse de l'ONPG.

Les substrats testés dans les 20 microtubes sont inoculés avec les bactéries dans une solution physiologique stérile. Les réactions produites pendant l'incubation de 18 à 24 heures à 37°C, se traduisent par des virages colorés spontanés ou induits par l'addition de réactifs appropriés :

- Réactif de Kovacs pour la recherche de la production d'indole ;

- Chlorure ferrique pour la recherche de tryptophane désaminase (TDA) ;
- Réactif VP1 ou solution d' α naphтол, le réactif VP2 ou solution aqueuse d' NaOH_4N pour le test de Voges Proskauer.

Au terme de cette incubation, les résultats obtenus sont convertis en grille de sept ou neuf données. Cette grille est ensuite traitée ou interprétée grâce à un catalogue analytique ou manuel API Profile Index.

II.2.2 : Antibiogramme :

L'étude des profils de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées a été effectuée par l'établissement d'antibiogramme réalisé selon la méthode recommandée par l'OMS et répondant aux critères définis par le CLSI et standardisées depuis 1999 en médecine vétérinaire en Algérie (OMS, 2008).

A. Principe :

Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé nutritif préalablement inoculé avec une dilution calibrée avec la bactérie à tester. Au cours de l'incubation (18 à 35°C) les antibiotiques se diffusent dans la gélose et inhibent la croissance de la bactérie à tester. Il en résulte la formation d'une zone annulaire transparente autour des disques d'antibiotiques. Treize antibiotiques appartenant à neuf familles différentes ont été testés (Tableau 4). Le choix de ces antibiotiques a été fait sur la base de leurs utilisations dans les différents traitements.

Tableau 4 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge du disque (μg)
Bétalactamines	Amoxicilline	AMX	10
	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	10
Céphalosporines	Ceftiofur	KF	30
Aminosides	Néomycine	N	30
	Gentamycine	CN	10
Sulfamides	Triméthoprim+sulfaméthoxazol	SXT	1,25
Tétracyclines	Tétracyclines	TE	30
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
	Fluméquine	UB	30
	Enrofloxacin	ENR	5
Polypeptides	Colistine	CT	10
Furanes	Nitrofurantoine	FT	300
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30

B. Mode opératoire :

Un milieu gélosé Mueller Hinton (MH) a été coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et ces géloses ont été séchées avant l'emploi.

Après une culture bactérienne pure de 18 h 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 15mn 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 sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

La lecture a été effectuée après 18 à 20 h d'incubation à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés, puis les résultats interprétés selon les critères du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2010).

II.2.3. La recherche des gènes Qnr par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR):

Cette étape s'est déroulée au niveau du service de la biologie moléculaire de l'Institut Pasteur d'Alger sur une période s'étalant du 9 janvier au 9 février 2011.

Les souches d'entérobactéries sélectionnées pour cette étude sont 18 souches résistantes à l'acide nalidixique, fuméquine et à l'enrofloxacin collectées au laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem. L'origine des souches testées par espèce est présentée dans le tableau 9.

La recherche des gènes de résistance Qnr A, B et S a été réalisée par PCR Multiplex après extraction de l'ADN total par « boiling method ».

A. Extraction de l'ADN par « Boiling method »

Après une culture pure d'une nuit sur un milieu gélosé nutritif à 37°C. On prélève un nombre important des colonies dans un tube Eppendorf contenant 1000 µl d'eau ultra pure qu'on centrifuge à 12000 tr/mn pendant 3 mn, auquel on élimine le surnageant avec la pipette, puis on re-suspend le précipité dans 300 µl d'eau ultra pure, qu'on re-centrifuge à 12000 tr/mn pendant 3 mn, et on le porte à ébullition dans un bain sec pendant 15 mn à 95°C, puis on le re-centrifuge une dernière fois à 12000 tr/mn pendant 3 mn (pour séparer l'ADN des autres constituants de la bactérie) et enfin on prélève délicatement 60 µl du surnageant dans un tube PCR à 0,5 µl et on le conserve à – 20 °C jusqu'à utilisation.

B. Réaction de la PCR

- **Principe:**

C'est l'amplification de manière importante, cyclique et spécifique d'un fragment d'ADN, grâce à une ADN polymérase (Taq polymérase : *Thermus aquaticus* polymérase) thermostable, en présence d'amorces spécifiques et de nucléotides.

- **Réalisation de la PCR:**

Une PCR multiplex a été réalisée pour détecter les gènes QnrA, QnrB et QnrS, en utilisant pour chacune, un couple d'amorce défini d'après des séquences connues et répétées du génome des bactéries. C'est ainsi qu'on obtient des profils spécifiques de chaque souche, selon l'emplacement et le nombre de copies de ces séquences dans le génome bactérien (Millemann et al. 2000).

Les volumes nécessaires à la réaction sont calculés, selon le nombre de souches à traiter, en prévoyant en plus le témoin négatif et le témoin positif.

Les amorces sont diluées selon les volumes nécessaires et le nombre de souches traitées.

Le mélange réactionnel est réalisé sous hotte de biologie moléculaire et comprend:

- Le volume nécessaire d'eau ultra Pure.
- Les volumes nécessaires d'amorces diluées.
- Le volume nécessaire du nucléotide dNTP.
- Le volume nécessaire du Tampon 10X.
- Le volume nécessaire de Taq DNA polymérase.

Le mix est ensuite réparti à 22,5 µl dans des tubes PCR, auxquels sont rajoutés 3 µl d'extrait

d'ADN. Les réactions sont alors effectuées dans un thermocycleur GeneAmp*PCR System 9700 (Fisher Bioblock, France).

- **Electrophorèse:**

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium à la concentration finale de 1 µg/ml, et tamponné avec du TBE 1X (Tris Borate Ethylène Diamine Tétracétique Acide). L'ADN migre sous une tension de 120 V, à un ampérage de 200 Ma (figure 6), pendant 1 h. La lecture s'effectue sous une lampe à Ultra-Violet (figures 7) avec un imageur.

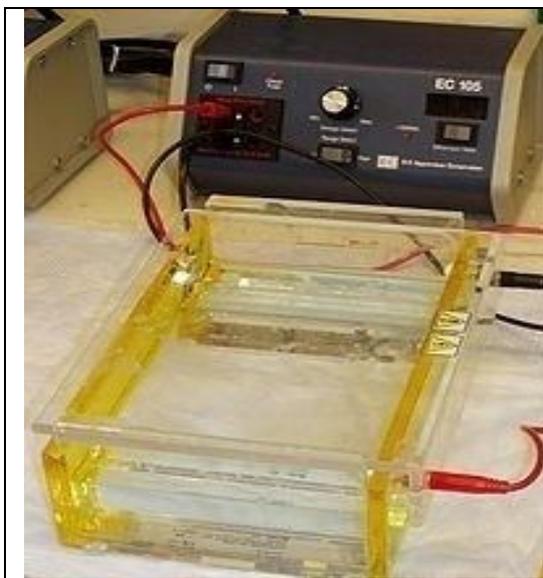


Figure 5 : Cuve remplie de tampon et transformateur utilisés pour l'électrophorèse en gel d'agarose

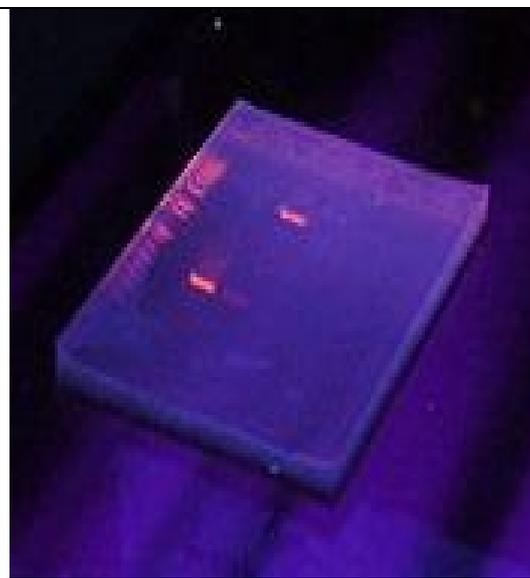


Figure 6 : Gel d'agarose exposé à des rayonnements ultraviolets, le BET colore l'ADN en une couleur rouge-orange

Annexe 1 : Milieux utilisés.

A-Milieu de pré-enrichissement :

L'eau peptonée tamponnée :

Composition :

-Peptone	10 g
-Chlorure de sodium(NaCl)	5 g
-Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na HPO-12HO) (ou hydrogénophosphate disodique anhydrate (Na HPO)	9 g 3,5g
-Dihydrogénophosphate de potassium (KHPO)	1,5 g
-Eau	1000 ml

B-Milieu d'enrichissement :

SFB : Sélinite acide de sodium

Composition :

-Tryptone	5 g
-Lactose	4 g
-Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté(Na HPO-12HO)	10 g
-Hydrogénosélénite de sodium(NaHSeO)	4 g
-	1000 ml

C-Milieu d'isolement :

1-Gélose hecktoen :

Composition :

-Peptone	12 g
-Extrait de levure	3 g
-Sels biliaires	9 g
-Lactose	12 g
-Saccharose	12 g
-Salicine	2 g
-Chlorure de sodium(NaCl)	5 g
-Thiosulfate de sodium	5 g
-Citrate ferrique ammoniacal	1,5 g

-Bleu de bromothyl	65 mg
-Fuschine acide	40 mg à 100 mg
-Agar	13,5 g
-Eau(5.1.1)	1000 ml

2-Gélose nutritive :

Composition :

-Peptone	15 g
-Extrait de viande	1 g
-NaCl	5 g
-Agar	15 g
-Eau distillée	1000 ml
-Ph 7	

3-Gélose mac Conkey :

Composition :

-Gelysate	17 g
-Polypeptone	3 g
-Lactose	10 g
-Sels biliaires	5 g
-Chlorure de sodium	5 g
-Gélose	12,5 g
-Rouge neutre	0,04
-PH7,4	

D-Milieus d'identification :

1-Gélose de glucose- lactose- saccharose- H2S/TSI

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

Composition :

-Peptone de viande	
-Proteose peptone	15g
-Extrait de viande	5g
-Extrait de levure	3g
-Glucose	3g
-Saccharose	1g
-Lactose	10g
-Citrate de fer ammoniacal	0,3g
-NaCl	5g
-Thiosulfate de sodium	0,3g
-Rouge de Phénol	0,05g
-Agar	18g
-Eau distillée	1000ml
-Ph =7,4	

2-Citrate de Simmons

Composition :

-Ammonium dihydrogenophosphate	1g
-Phosphate dipotassique	1g
-NaCl	5g
-Citrate de Na	2g
-Sulfate de Mg	0,2g
-Bleu de bromothymol	0,08g
-Agar	18g
-Eau distillée	1000ml
-Ph =6,6	

3-Mannitol mobilité

Milieu utilisé pour la mise en évidence de la mobilité et de l'utilisation du mannitol.

Composition :

-Peptone tryptique de viande	20g
-Mannitol	2g
-Rouge de phénol	4ml
-Agar	4g
-Eau distillée	1000ml
-Ph =7,8	

4-Milieu Urée-Indol

Composition :

-L-tryptophane	0,3g
-KH ₂ PO ₄	0,1g
-K ₂ HPO ₄	0,1g
-Nacl	0,5g
-Urée	2,0g
-Alcool à 95°	1,0g
-Rouge de phénol à 1%	0,25g
-Eau distillée	100ml

5-Milieu LDC

Composition :

-L-lysine (monochlorhydrate)	5g
-extrait de levure	3g
-Nacl	5g
-Glucose	1g
-Bromocrésol pourpre (1,6g/100ml alcool à 95°)	1ml
-Eau distillée	1L

6-Milieu ODC

Composition :

-L-ornithine (monochlorhydrate)	5g
-Extrait de levure	3g
-Nacl	5g
-Glucose	1g
-Bromocrésol pourpre (1,6g/100ml alcool à 95°)	1ml
-Eau distillée	1L

7-Milieu ADH

Composition :

-L-arginine (monochlorhydrate)	5g
-extrait de levure	3g
-Nacl	5g
-Glucose	1g
-Bromocrésol pourpre	1ml
-Eau distillée	1L

E-Milieu pour l'antibiogramme :

Mueller Hinton :

Composition :

-Extrait de viande	3 g
-Hydrlysate acide de caseine	17,5 g
-Amidon	1,5 g
-Agar	16 g
-Eau distillée	1000 ml
-PH7,3	

Annexe 12 : Résultats de l'antibiogramme d'*Entérobacter cloacea*.

Régions			Mostaganem		Mascara		Tiaret		Relizane		Chlef		Total	
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	NT	M %
B-Lactamines	AMX	R+I	8	88,88	16	94,11	/	/	/	/	/	/	24	92,30
		S	1	11,11	1	5,88	/	/	/	/	/	/	2	7,69
	AMC	R+I	5	55,55	7	41,17	/	/	/	/	/	/	12	46,15
		S	4	44,44	10	58,82	/	/	/	/	/	/	14	53,84
Cephalosporines	EFT	R+I	1	11,11	5	29,41	/	/	/	/	/	/	6	23,07
		S	8	88,88	12	70,58	/	/	/	/	/	/	20	76,92
Quinolones	NA	R+I	7	77,77	13	76,47	/	/	/	/	/	/	20	76,92
		S	2	22,22	4	23,52	/	/	/	/	/	/	6	23,07
	UB	R+I	8	88,88	14	82,35	/	/	/	/	/	/	22	84,61
		S	1	11,11	3	17,64	/	/	/	/	/	/	4	15,38
	ENR	R+I	5	55,55	12	70,58	/	/	/	/	/	/	17	65,38
		S	4	44,44	5	29,41	/	/	/	/	/	/	9	34,61
Tétracyclines	TE	R+I	5	55,55	15	88,23	/	/	/	/	/	/	20	76,92
		S	4	44,44	2	11,76	/	/	/	/	/	/	6	23,07
Sulfamides	SXT	R+I	1	11,11	13	76,47	/	/	/	/	/	/	14	53,84
		S	8	88,88	4	23,52	/	/	/	/	/	/	12	46,15
Aminosides	N	R+I	0	0	6	35,29	/	/	/	/	/	/	6	23,07
		S	9	100	11	64,70	/	/	/	/	/	/	20	76,92
	CN	R+I	0	0	1	5,88	/	/	/	/	/	/	1	3,84
		S	9	100	16	94,11	/	/	/	/	/	/	25	96,15
Polypeptides	CT	R+I	1	11,11	5	29,41	/	/	/	/	/	/	6	23,07
		S	8	88,88	12	70,58	/	/	/	/	/	/	20	76,92
Furanes	FT	R+I	2	22,22	5	29,41	/	/	/	/	/	/	7	26,92
		S	7	77,77	12	70,58	/	/	/	/	/	/	19	73,07
Phénicolés	C	R+I	1	11,11	1	5,88	/	/	/	/	/	/	2	7,69
		S	8	88,88	16	94,11	/	/	/	/	/	/	24	92,30

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline+acide clavulanique, EFT : Cefotiofur, NA : Acide nalidixique, UB : Fluméquine, ENR : Enrofloxacin, TE : Tétracycline, SXT : Triméthoprim+Sulfaméthoxazole, N : Neomycine, CN : Gentamycine, CT : Colistine, FT : Nitrofurantoïne, C : Chloramphénicol, NT : nombre total, M % : moyenne de pourcentage.

Annexe 13 : Résultats de l'antibiogramme d'*Klebsiella pneumoniae*.

Régions			Mostaganem		Mascara		Tiaret		Relizane		Chlef		Total	
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	NT	M %
B-Lactamines	AMX	R+I	10	100	6	100	/	/	/	/	/	/	16	100
		S	0	0	0	0	/	/	/	/	/	/	0	0
	AMC	R+I	5	50	4	66,66	/	/	/	/	/	/	9	56,25
		S	5	50	2	33,33	/	/	/	/	/	/	7	43,75
Cephalosporines	EFT	R+I	4	40	3	50	/	/	/	/	/	/	7	43,75
		S	6	60	3	50	/	/	/	/	/	/	9	56,25
Quiolones	NA	R+I	9	90	6	100	/	/	/	/	/	/	15	93,75
		S	1	10	0	0	/	/	/	/	/	/	1	6,25
	UB	R+I	9	90	6	100	/	/	/	/	/	/	15	93,75
		S	1	10	0	0	/	/	/	/	/	/	1	6,25
	ENR	R+I	9	90	6	100	/	/	/	/	/	/	15	93,75
		S	1	10	0	0	/	/	/	/	/	/	1	6,25
Tétracyclines	TE	R+I	9	90	5	83,33	/	/	/	/	/	/	14	87,5
		S	1	10	1	16,66	/	/	/	/	/	/	2	12,5
Sulfamides	SXT	R+I	6	60	3	50	/	/	/	/	/	/	9	56,25
		S	4	40	3	50	/	/	/	/	/	/	7	43,75
Aminosides	N	R+I	4	40	0	0	/	/	/	/	/	/	4	25
		S	6	60	6	100	/	/	/	/	/	/	12	75
	CN	R+I	1	10	0	0	/	/	/	/	/	/	1	6,25
		S	9	90	6	100	/	/	/	/	/	/	15	93,75
Polypeptides	CT	R+I	2	20	0	0	/	/	/	/	/	/	2	12,5
		S	8	80	6	100	/	/	/	/	/	/	14	87,5
Furanes	FT	R+I	6	60	1	16,66	/	/	/	/	/	/	7	43,75
		S	4	40	5	83,33	/	/	/	/	/	/	9	56,25
Phénicolés	C	R+I	4	40	1	16,66	/	/	/	/	/	/	5	31,25
		S	6	60	5	83,33	/	/	/	/	/	/	11	68,75

Annexe 2 : Tableau de lecture des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour entérobactéries (Espèce aviaire) (OMS, 2008)

Conditions du test :

Milieu : Gélose Muller-Hinton

Inoculum : Colonies en suspension, 0,5 Mc Farland

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
<u>B-lactamines</u>				
Ampicilline	10 µg	≤13	14 – 16	≥17
Amoxicilline	10 µg	≤14	/	≥21
Amoxicilline+acide clavulanique	20/10 µg	≤13	14 – 17	≥18
Ceftiofur	30 µg	≤17	18 – 20	≥21
Cephalothine	30µg	≤14	15 – 17	≥18
<u>Aminosides</u>				
Néomycine	30 µg	≤13	14-17	≥18
Gentamycine	10 µg	≤12	13-14	≥15
<u>Sulfamides</u>				
Triméthoprim+sulfaméthoxazole	1,25/23,75µg	≤10	11-15	≥16
<u>Tétracyclines</u>				
Tétracyclines	30µg	≤14	15-18	≥19
<u>Quinolones</u>				
Acide nalidixique	30µg	≤13	14-18	≥19
Fluméquine	30µg	≤21	/	≥25
Norfloxacine	10µg	≤12	13-16	≥17
Enrofloxacine	5µg	≤16	17-22	≥23
<u>Polypeptides</u>				
Colistine	10µg	≤10	11-12	≥13
<u>Furanes</u>				
Nitrofurantoïne	300µg	≤14	15-16	≥17
<u>Phénicolés</u>				
Chloramphénicol	30µg	≤12	13-17	≥18

Annexe 3: valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour la souche de référence utilisée pour le contrôle de qualité « Souche *E. coli* ATTC 25922 » (OMS, 2008).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètre critique (mm)
Ampicilline	10 µg	16 – 22
Amoxicilline+acide clavulanique	20/10 µg	19 – 25
Acide nalidixique	30 µg	22 – 28
Ceftiofur	30 µg	26 – 31
Cephalothine	30 µg	15 – 21
Colistine	10 µg	11 – 12
Chloramphénicol	30 µg	21 – 27
Enrofloxacin	5 µg	32 – 40
Furanes	300 µg	20 – 25
Gentamicine	10 µg	19 – 26
Neomycine	30 µg	17 – 25
Spectinomycine	100 µg	21 – 25
Trimetoprim+sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	23 – 29
Tétracycline	30 µg	18 – 25

Annexe 4 : Valeurs critiques pour les molécules antibiotiques ne figurant pas sur les tables du CLSI (d'après les recommandations du Comité Français de l'antibiogramme de Janvier 2007)

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (mm)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
Acide oxolinique	10 µg	< 14	----	≥ 21
Amoxicilline	25 µg	< 14	----	≥ 21
Acide nalidixique	30µg	----	----	≥ 21
Cefalexine	30 µg	< 12	----	≥ 18
Flumequine	30 µg	< 21	----	≥ 25
Gentamicine	500 µg	< 11	----	≥ 17
Spiramycine	100 µg	< 19	----	≥24
Streptomycine	10 µg	< 13	----	15

Annexe 5 : Liste des antibiotiques utilisés à titre curatif (OMS, 2008)

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques	Familles d'antibiotiques	Antibiotiques
Beta lactamines	Ampicilline/amoxicilline Amoxicilline+acide clavulanique Oxacilline Penicilline Cefalexine Ceftiofur/cefotaxime Cephalotine	Quinolones	Acide nalidixique Acide oxolinique Flumequine Norfloxacin Enrofloxacin
Aminosides	Neomycine	Tetracyclines	Tetracycline
Macrolides	Tilmicosine Erythromycine Spiramycine		
Polypeptides	Colistine	Glycopeptides	Vancomycine
Sulfamides	Trimetoprime+sulfamethoxazole		

Annexe 6 : Phénotypes de résistance naturelle des principaux genres et espèces d'entérobactéries (d'après le communiqué du CASFM de janvier 2005)

Espèce/Genre	AM	AMC	C1G	GM	TET	COL	FT
<i>Klebsiella</i>	R						
<i>Citrobacter diversus</i>	R						
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R				
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R				
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R			R	
<i>Proteus mirabilis</i>					R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R		R			R	R
<i>Morganella morganii</i>	R	R	R			R	R
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R		R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R				

R : résistance naturelle ; AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; C1G : céphalosporines de 1 génération ; GM : gentamycine ; TET : tétracyclines ; COL : colistine ; FT : nitrofuranes.

Annexe 7 : Test d'oxydase.

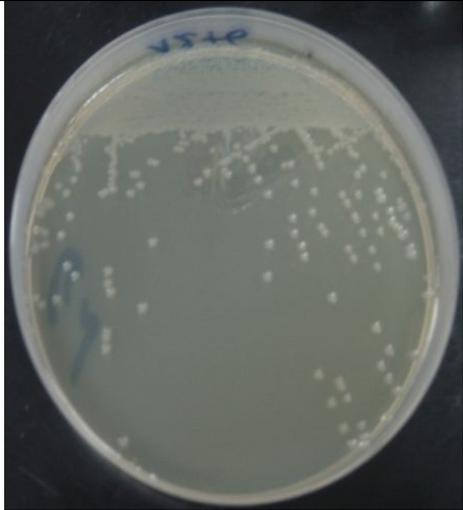


Test d'oxydase négatif (aucun virage au couleur)

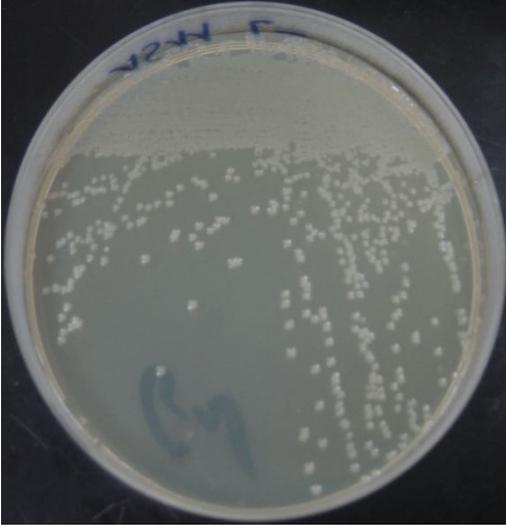
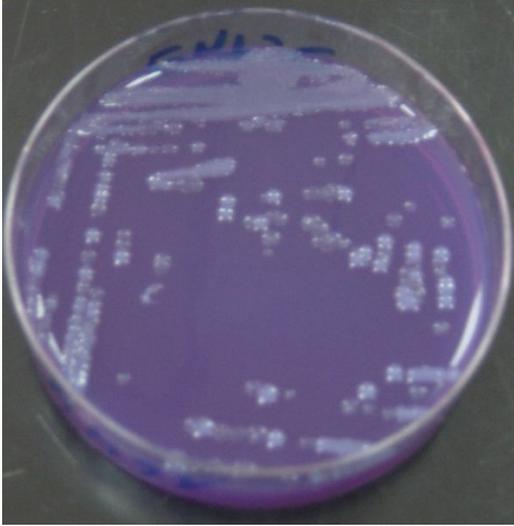
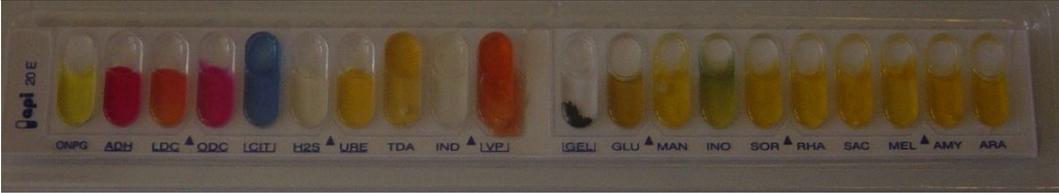


Test d'oxydase positif (virage de couleur vers le violet).

Annexe 8 : Caractères biochimiques et cultureux d'*Escherichia coli*.

	
GN : Colonies lisses à bords réguliers de 2 à 3 mm de diamètre.	BCP: Colonies jaune (lactose positive)
	
Profil biochimique d' <i>E. coli</i> sur galerie API 20 E	

Annexe 9 : Caractères biochimiques et cultureux d'*Enterobacter cloacae*

	
GN: colonies plus ou moins rondes, légèrement irisées ou plates à bord irréguliers de 2-3mm de diamètre	BGP: colonies jaunes ou pourpres (Lactose +/-)
	
Profil biochimique d' <i>Enterobacter cloacae</i> sur galerie API 20 E	



Annexe 10 : bain sec : utilisé pour l'extraction de l'ADN



Annexe 11 : Thermocycleur : appareil automatisant la réaction de PCR classique