

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

UNIVERSITE MOULOU D MEMMERI DE TIZI OUZOU.
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET AGRONOMIQUES.
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE.



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme Master en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Sujet

Caractérisation phénotypique de l'antibiorésistance et de quelques facteurs de virulence de souches d'*E.coli* pathogènes aviaires (APEC)

Réalisée par :

M^{elle} OUSAAD Houria & M^{elle} RABET Nadia

Soutenu le 17 /10 /2017 devant le jury composé de :

Président : Mme IRATNI AICHEG.	Maître de conférences à l'UMMTO.
Promotrice : Mme MEGUENNI N.	Maître de conférences à l'UMMTO.
Examineur : Mr MEDJKOUN N.	Maître Assistant classe A à l'UMMTO.
Examineur : Mr MOUALEK I.	Maître Assistant classe A à l'UMMTO.

Année universitaire : 2016-2017

Remerciement

*Nous tenons tout d'abord à remercier **le bon Dieu**, créateur de l'univers de nous avoir donnée la force et l'énergie nécessaire pour accomplir ce modeste travail. Rien n'aurait pu avoir lieu sans sa bénédiction.*

*Nos remerciements les plus distingués pour notre promotrice Docteur **MEGUENNI Nassima**, maître de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour le savoir qu'elle nous a transmis avec beaucoup de patience, sa disponibilité, la confiance qu'elle nous a accordée, sans soutiens, elle n'a cessé de nous encourager tout le long, elle a guidé notre travail avec beaucoup de rigueur et de sérieux ce qui a forcé notre admiration et notre respect.*

Nous remercions les membres du jury pour avoir fait le déplacement aujourd'hui et pour avoir pris de leur temps afin de juger notre modeste travail sachez messieurs et mesdames les jurys que nous sommes honorées.

*Nous remercions madame **IRATENI AICHE Ghenima**, maître de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour votre patience et votre gentillesse ainsi que pour vos précieux conseils.*

*Nous tenons à remercier monsieur **MEDJKOUN Nadir**, maître assistant classe A, tout d'abord pour nous avoir transmis une partie de son savoir au cours de notre cursus. Nous sommes honorées et très chanceuses de vous avoir comme membre de jury, nous tenons aussi à vous manifester notre grande admiration et profond respect.*

*Nous tenons à remercier monsieur **MOUALEK Idir**, maître assistant classe A, pour nous avoir instauré une bonne ambiance de travail et de nous avoir mises à l'aise, nous vous remercions pour nous avoir aidé, orienter et si bien conseiller, nous retiendrons votre épatant dynamisme.*

*Nous tenons à remercier tout particulièrement professeur **HOUALI karim**, maître de conférence à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, d'abord pour nous avoir fourni l'accès au laboratoire de biochimie analytique et de biotechnologie*

(LABAB) ensuite pour avoir partagé vos vastes connaissances avec nous, nous sommes honorées d'avoir pu apprendre et évoluer à vos côtés durant cette courte période.

Nos remerciements Madame **KECHIH-BOUNAR Saliha**, responsable du laboratoire de bactériologie au laboratoire vétérinaire régional de Draa Ben Kheda pour nous avoir fourni les souches aviaires d'E.coli et pour son aide et sa compréhension.

Nous remercions monsieur **DEGUICHE**, pour son aide, sa compréhension, sa patience et ses précieux conseils.

Nous tenons à remercier monsieur **TITOUCHE**, Mr **CHERGUI**, Mr **SEBBANE**, Madame **SALMI**, Mme **DERMECHE** et Mme **LAHCEN** pour leurs aides, leurs compréhensions, leurs patientes et de nous avoir si bien orientées.

Nous remercions monsieur **BARIZ Karim**, pour nous avoir fourni une souche d'E.coli (réceptrice qui nous était indispensable pour notre travail) ainsi que pour ces astuces pratiques.

Nous remercions monsieur **YEZID** et madame **ALI AHMED** pour avoir gentiment accepté de nous aider pour l'analyse statistique un point clef de notre travail que nous n'aurions pas pu faire sans eux.

Nous tenons aussi à remercier les **ingénieurs laboratoire (particulièrement Houria et Sonia)** pour leurs conseils, aides et la patience dont elles ont fait preuve envers nous.

Remercie toutes les personnes, ayant participés de loin ou de prêt à la réalisation de ce travail nous tenais à cœur, ainsi que les laboratoires qui nous ont gentiment aidés (laboratoire **KHELIL Said** de Larbâa Nathe Irathen et laboratoire de Iferhounen).

Merci 

Dédicace

Á la mémoire de ma chère mère,

Qui est restée toujours dans mon esprit et dans mon cœur.
Je lui dédie aujourd'hui ma réussite, à laquelle elle aurait voulu assister.
Que Dieu le tout puissant t'accueille dans son éternel paradis.

Á mon père,

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être.
Merci pour les valeurs nobles et le soutien permanent venu de toi.

Á mes sœurs,

Je ne trouve pas les mots justes et sincères pour vous exprimer mes sentiments.
Je vous remercie pour tous les encouragements et le soutien moral tout au long de mes études.

Á mes frères,

Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance et de courage.

Á mes beaux-frères et belles sœurs,

Je vous remercie d'être toujours avec moi au moindre souci.

Á mes petits neveux et nièces,

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous.
Puisse Dieu vous garder, éclairer votre chemin de vie et vous aider à réaliser tous vos vœux les plus chers.

Á mes amis (es),

Á ma binôme Nadia.

Houria
(Thiziri)

Dédicace

Je dédie ce travail

Tout d'abord à ma chère maman **LIMANI Taous**, qui représente tout simplement tout pour moi.

A mes oncles et mes tantes pour leurs aides et leur patience envers moi, tout particulièrement **LIMANI Mohend-Amezian** pour m'avoir pris sous son aile.

A mon cousin et cousines pour leur soutien.

A mes camarades et amies de promotions, pour leur aides et leur soutiens morale.

A toutes les personnes (amies, proches), qui m'ont conseillé, orienté, aidé et soutenu.

Á ma binôme Thiziri

Nadia

Résumé

Cette étude a porté sur l'étude de l'antibiorésistance d'isolats d'*E.coli* d'origines aviaires issus de lésions de colibacillose, provenant de la région du centre Algérien et sur la recherche phénotypique de facteurs de virulence associés (résistance au sérum, production d'hémolysine et fixation au Rouge Congo). Les résultats ont montré que sur 50 souches testées, 98% étaient multirésistantes. Des taux de résistance élevés ont été enregistrés vis-à-vis des quinolones avec 76%, 66% et 54% respectivement pour l'acide Nalidixique, l'ofloxacine et la ciprofloxacine. De même, des niveaux élevés de résistance ont été observés pour la tétracycline, la ticarcilline, l'ampicilline et l'amoxicilline avec 86%, 66%, 64% et 60% respectivement. En revanche, les souches d'*E.coli* se sont avérées moyennement résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique avec un taux de résistance de 47%. La tobramycine, l'imipénème et la colistine restent des molécules actives. Les essais de transfert par conjugaison bactérienne ont montré le caractère plasmidique de la résistance à l'amoxicilline sur l'ensemble des souches testées. Par contre, le caractère de résistance à l'acide Nalidixique n'a été transféré que sur deux souches sur les quatre testées. En raison de la diversité génétique des APEC, aucun schéma de profil de virulence n'a été proprement établi sur des souches Algériennes. Cependant certains facteurs de virulence leur sont associés, tels que la résistance au sérum, la fixation du rouge Congo et l'hémolysine. Dans cette étude, les fréquences observées ont révélé que la quasi-totalité des souches étaient résistantes au sérum, productrices de l'hémolysine et 42% fixatrices du rouge Congo. Par ailleurs, l'analyse statistique : test de Khi-deux (test d'indépendance), a permis d'établir une corrélation entre le caractère de l'antibiorésistance des souches d'APEC et leur virulence, en effet la valeur de p-value (2.2×10^{-16}) est inférieure à α .

Mot clé : APEC, colibacillose, antibiorésistance, virulence, corrélation, multirésistance.

Summary

In this study, strains of avian *E.coli* isolated from colibacillosis lesions, collected from different regions of center of Algeria, were studied for the antimicrobial resistance and phenotypic searching of associated virulence factors (serum resistance, hemolysin production and Congo red fixation). Among the 50 strains tested, 98 % were multiresistant. High levels of resistance were observed for quinolones with 76%, 66% and 54% respectively for Nalidixic acid, ofloxacin and ciprofloxacin. High levels of resistance were also recorded for Tetracycline, ticarcillin, ampicillin and amoxicillin with 86%, 66%, 64% and 60% respectively. On the other hand, the strains of *E.coli* were found to be modestly resistant to the association amoxicillin-clavulanic acid with 47%. Tobramycin, imipenem and colistin remain active molecules. The conjugation transfer assays showed the plasmidic character of the resistance to amoxicillin on all of the strains tested. Whereas the character of resistance to Nalidixic acid was transmitted only for two strains on the four tested. Because of the genetic diversity of APECs, no pattern of virulence profile was properly established on Algerian strains. However, they are associated with some virulence factors, such as resistance to serum, fixation of Congo red and hemolysin. In this study, the observed frequencies revealed that almost all strains were resistant to serum, producing hemolysin and 42% fixing Red Congo. Following a statistical analysis: chi-square test (independence test), there seems to be a correlation between the character of antibiotic resistance of APEC strains and their virulence, in fact the value of P-value is lower than α .

Key Words: APEC, colibacillosis, antimicrobial resistance, correlation, virulence, multiresistance.

Sommaire

Page

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction	1
Chapitre I : Etude bibliographique	
1. Généralité sur <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.Historique.....	3
1.2.Les caractéristiques bactériologiques de l'espèce.....	3
1.2.1. Les caractères morphologiques.....	3
1.2.2. Les caractères culturels.....	4
1.2.3. Les caractères biochimiques.....	4
1.2.4. Les caractères antigéniques.....	4
1.3.Classifications.....	5
1.3.1. Classification selon Bergy's.....	5
1.3.2. Classification selon les pathotypes.....	5
1.3.2.1.Les <i>E.coli</i> pathogènes intestinales (IPEC).....	5
1.3.2.2.Les <i>E.coli</i> pathogènes extra-intestinales (ExPEC).....	5
1.4.Les <i>E. coli</i> pathogènes aviaires (APEC) et la colibacillose.....	6
1.4.1. Les APEC.....	6
1.4.2. La colibacillose.....	6
1.4.2.1.Définition.....	6
1.4.2.2.Développement de l'infection.....	6
1.4.2.3.Prophylaxie.....	6
2. Généralité sur les antibiotiques.....	7
2.1.Définitions.....	8
2.2.Classification des antibiotiques.....	8
2.2.1. Selon la nature chimique.....	8
2.2.1.1.Les bêta-lactamines.....	8
2.2.1.2. Les aminosides.....	8
2.2.1.3.Les quinolones et fluoroquinolones.....	9
2.2.1.4. Les tétracyclines.....	9
2.2.1.5. Les polymyxines.....	10
2.2.1.6.Les sulfamide- triméthoprimes.....	11
2.2.1.6.1. Les sulfamides.....	11
2.2.1.6.2. Letriméthopriime.....	11
2.2.2. Classification selon l'origine.....	11
2.2.3. Classification selon leur spectre d'action.....	12
2.2.4. Classification selon l'effet antibactérien.....	12

2.2.5. Classification selon les sites d'action.....	12
2.3.Mécanismes d'action des antibiotiques.....	12
2.3.1. Les bêta-lactamines.....	13
2.3.2. Les aminosides.....	13
2.3.3. Les quinolones.....	13
2.3.4. Les tétracyclines.....	14
2.3.5. Les polymyxines.....	14
2.3.6. Les sulfamides et le triméthoprim.....	15
2.4. L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire.....	15
3. La résistance aux antibiotiques.....	16
3.1.Définition de la résistance.....	17
3.2.Le support génétique de la résistance.....	17
3.2.1. La résistance naturelle.....	17
3.2.2. La résistance acquise.....	17
3.2.2.1.Par mutation de gène endogène spontanément.....	17
3.2.2.2. Par transfert horizontalde gènes (HGT).....	18
3.3.Transmission de la résistance.....	18
3.3.1. La conjugaison bactérienne.....	18
3.3.2. La transformation.....	19
3.3.3. La transduction.....	19
3.4.Mécanismes de résistance.....	20
3.4.1. Les mécanismes de résistance aux bêta-lactamines.....	20
3.4.1.1. β -lactamase.....	21
3.4.1.2. Imperméabilité de la membrane externe.....	21
3.4.1.3. Efflux actif.....	21
3.4.1.4. Modification de PLP.....	22
3.4.2. Les mécanismes de résistance aux aminosides.....	22
3.4.3. Mécanismes de résistance aux quinolones.....	22
3.4.4. Mécanismes de résistance aux tétracyclines.....	22
3.4.5. Mécanismes de résistance aux polymyxines.....	23
3.4.6. Mécanismes de résistance à l'association sulfamides et triméthoprim.....	23
3.4.6.1. Les sulfamides.....	23
3.4.6.2. Le triméthoprim.....	23
4. La virulence et facteurs de virulence.....	24
4.1. Définitions.....	26
4.1.1. La virulence.....	26
4.1.2. Les facteurs de virulence.....	26
4.2.Les facteurs de virulence.....	26
4.2.1. La résistance au sérum.....	26
4.2.1.1. Le système complément.....	26
4.2.1.2. Mécanismes de résistance au sérum.....	27
4.2.1.2.1. La capsule.....	27
4.2.1.2.2. Les protéines de la membrane externe.....	27
4.2.1.2.2.1. Les protéines codées par des gènes plasmidiques.....	28

4.2.1.2.2.2. Les protéines codées par des gènes chromosomiques	28
4.2.1.2.2.2.1. La Protéine A de la membrane externe (Omp A).....	29
4.2.1.2.2.2.2. La protéine W de la membrane externe (Omp W).....	29
4.2.1.2.2.2.3. La protéine C de la membrane externe (Omp C).....	29
4.2.2. La fixation du rouge Congo	30
4.2.3. La production de l'hémolysine.....	30
4.3. Relation entre la résistance aux antibiotiques et la virulence.....	31
4.4. Relation entre les APEC et les extra-intestinal infectant les humains.....	31

Chapitre II : Etude expérimentale

Matériel et méthodes	33
1. Matériel	33
1.1.Souches biologique	33
1.1.1. Souches testées.....	33
1.1.2. Souches de références	33
1.2.Matériel du laboratoire.....	33
2. Méthodes.....	33
2.1.Isolement.....	33
2.2. Identification.....	34
2.3.Antibiogramme.....	35
2.4. Contrôle de qualité.....	36
2.5.Recherche des β -lactamases à spectre élargie.....	38
2.6. Conservation des souches.....	38
2.7. La conjugaison bactérienne.....	38
2.8. La recherche de facteurs de virulence.....	40
2.8.1. La résistance au sérum.....	40
2.8.2. La fixation du rouge Congo.....	41
2.8.3. L'hémolysine.....	41
2.9. Analyse statistique.....	42
2.9.1. Test de Khi-deux.....	42
2.9.2. Lecture	42
Résultats et discussion	44
1. Résultats.....	44
1.1. Isolement.....	44
1.2. Identification.....	44
1.2.1. Etude macroscopique.....	44
1.2.2. La coloration de Gram.....	45

1.2.3. Résultats des tests biochimiques.....	45
1.3. Résultats des antibiogrammes.....	47
1.4. Conjugaison bactérienne.....	53
1.5. Facteurs de virulence.....	54
1.6.Résultat de l'analyse statistique	57
2. Discussion	58
Conclusion.....	63
Références bibliographiques.....	65
Annexes.....	72

Abréviations

Abréviation

Ag :	Antigène
ATB :	Antibiotique
APEC :	<i>Escherichia coli</i> pathogène aviaire
AZ :	Azide de sodium
Bt :	Bâtiments
BHI :	Brainheart infusion
BLSE :	Bêta-lactamase à spectre étendu
C1 :	Complément component 1
C3b :	Complément component 3b
C3 convertase :	Complément component 3 convertase
C4b :	Complément component 4b
C4BP :	Complément 4 bindingprotéin
CA-SFM :	Comité des antibiogrammes de la Société Française de Microbiologie
DCLS :	Désoxycholate-citrate-lactose-saccharose
DDS :	Double disque synergie
DHFR :	dihydrofolate réductase
DHPS :	Dihydrofolate synthétase
EAEC :	<i>Escherichia coli</i> entéroagrégative
<i>E.coli</i> ATCC	<i>Escherichia coli</i> Américain type culture collection
EDS :	Eau distillé stérile
EPS :	Eau physiologique stérile
EHEC :	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
EPEC :	<i>Escherichia coli</i> entéropathogène
ETEC :	<i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes
ExPEC :	<i>Escherichia coli</i> pathogène extra-intestinale
FH :	Facteur H
IPEC :	<i>Escherichia coli</i> pathogène intestinale

Abréviations

<i>Iss</i> :	<i>Increased gene survival</i>
LPS :	Lipopolysaccharide
MAC :	Complexe d'attaque membranaire
MF :	Matières fécales
MH :	Mueller Hinton
Nlpl :	new lipoprotéine
NF :	Normes française
NMEC :	<i>Escherichia coli</i> causant une méningite néonatale
NTEC :	<i>Escherichia coli</i> necrotoxigenique
Og :	Organes.
Omp A :	Outer membrane protein A
OmpF :	Outer membrane protéin F
Omp C :	Outer membrane protein C
Omp W :	Outer membrane protein W
PABA :	l'acide p-aminobenzoïque
PC :	Poulet de chair
PFP :	Poule future pondeuse
PLP :	Protéines de liaison aux pénicillines
PP :	Poule pondeuse
PR :	Poule reproductrice
PRP :	Poulette reproductrice pondeuse
Ps P :	Poussin ponte
RN :	Nitrate réductase
SEPEC :	<i>Escherichia coli</i> associée à la septicémie
ST :	Sequence types
TDA :	Tryptophane désaminase
<i>TraT</i> :	<i>Transfert T</i>
TSA :	Tryptase-Soja-Agar
UPEC :	<i>Escherichia coli</i> uropathogène.
VTEC :	<i>Escherichia coli</i> verotoxigenique.

Abréviations

Abréviations des antibiotiques

AMC :	Augmentin : Amoxicilline + acide clavulanique
AMP :	Ampicilline
AMX :	Amoxicilline
AK :	Amikacine
ATM :	Azetreonam
CAZ :	Céftazidime
CIP :	Ciprofloxacine
Cs :	Colistine
CTX :	Céfotaxime
CZ :	Céfazoline
ETP :	Ertapénème
FEP :	Cefepime
GEN :	Gentamicine
IMP :	Imipénème
K :	Kanamycine
KF :	Céfalotine
NA :	Acide nalidixique
OFX :	Ofloxacine
PA :	Acide pipémidique
PF :	Péfloxicine
TE :	Tétracycline
TIC :	Ticarcilline
TOB :	Tobramycine
STX :	Cotrimoxazole : Triméthoprimine + sulfaméthoxazole

Abréviations

Unités

°C : Degré Celsius

cm : Centimètre

g : Gramme

h : Heure

min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

S : Svedberg

µg : Microgramme

µl : Microlitre.

Liste de figure

Etude bibliographique

Figure 01:	Le noyau bêta-lactame (à gauche) ;Structure chimique de l'acide clavulanique (à droite).....	9
Figure 02 :	Structure de la streptomycine.....	9
Figure 03 :	Structure des quinolones et fluoroquinolones.....	10
Figure 04 :	Structures chimique des tétracyclines et chlorotétracycline.....	10
Figure 05 :	Structures chimique de la colistine A (polymyxine E).....	11
Figure 06:	Structures chimique du sulfaméthoxazole et triméthoprim.....	11
Figure 07:	Structure chimique du sulfamide et son analogue de structure PABA, un précurseur de synthèse des folates.....	15
Figure 08 :	les différents mécanismes d'actions des antibiotiques.....	16
Figure 09 :	Les différents mécanismes de transfert horizontal des gènes de résistance.....	19
Figure 10 :	Schéma illustrant les différentes voies de transmission probables de l'antibiorésistance.....	20
Figure 11 :	Inactivation des bêta-lactamines par les β -lactamases.....	21
Figure 12 :	Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	25
Figure 13 :	Différents mécanismes de résistance au sérum utilisés par les APEC....	30

Matériel et méthodes

Figure 14 :	Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale.....	43
--------------------	--	----

Résultats

Figure 15 :	Photo de colonies Lac + d' <i>E.coli</i> sur milieu DCLS.....	44
Figure 16 :	Observation microscopique de frottis après une coloration différentielle de souches d' <i>E.coli</i> suspectes (Gx1000).....	45
Figure 17 :	Photos illustrant les résultats des tests biochimiques.....	46
Figure 18 :	Taux de résistance et de sensibilité aux antibiotiques des souches d' <i>E.coli</i>	48
Figure 19 :	Répartition des souches en groupes en fonction du nombre de résistance et de sensibilité.....	49
Figure 20 :	Variation des pourcentages de souches résistantes en fonction du nombre d'antibiotiques.....	50
Figure 21 :	Quelques photos illustrant les résultats des antibiogrammes.....	51
Figure 22 :	Transconjugants issus du transfert de la résistance à l'amoxicilline observés sur milieu MH additionné d'amoxicilline et azide de sodium (AMX-AZ).....	52
Figure 23 :	Photos illustrant les résultats du transfert des caractères de résistances à l'acide Nalidixique.....	52

Liste des figures

Figure 24 :	Résultats de la recherche phénotypique des facteurs de virulences.....	53
Figure 25 :	Pourcentage des souches en fonction du nombre de facteur de virulence associé.....	54
Figure 26 :	Photos illustrant la recherche de la résistance au sérum.....	54
Figure 27 :	Photos illustrant la recherche de la fixation du rouge Congo.....	55
Figure 28 :	Photos illustrant les résultats des tests de l'hémolysine.....	55
Figure 29 :	Résultat du test d'indépendance de Khi-deux (sous le logiciel R).....	56

Annexes

Figure 30 :	Structure de base des pénames (à gauche), structure de la pénicilline (à droite).....	91
Figure 31 :	Structure de base des céphèmes (à gauche), structure d'une céphalosporine(à droite).....	91
Figure 32 :	Schéma récapitulatif de l'antibiogramme.....	92
Figure 33 :	Schéma récapitulatif du transfert des caractères de résistance par conjugaison bactérienne.....	93
Figure 34:	Schéma récapitulatif des tests de recherches des facteurs de virulences...	94

Liste des tableaux

Tableau I :	Identification : Principaux tests biochimiques de l'identification d' <i>E.coli</i>	34
Tableau II :	Les disques d'antibiotiques et leurs charges.	37
Tableau III :	Détails des préparations utilisées pour la conjugaison.	40
Tableau IV :	Caractéristiques des colonies suspectes d' <i>E.coli</i>	44
Tableau V :	La clef d'identification des entérobactéries de LE MINOR et VIRON (1982).....	77
Tableau VI :	Résultats des tests biochimiques et quelques détails concernant les souches étudiées.....	78
Tableau VII :	Le profil de l'antibiorésistance des souches testées.....	83
Tableau VIII :	Résultats des tests de virulence effectuée sur les souches étudiées.....	89

Liste des annexes

Annexe 01 : Matériel utilisé.....	72
Annexe 02 : Milieux de culture et compositions.....	73
Annexe 03 : Coloration de Gram.....	76
Annexe 04 : Tableaux.....	77
Annexe 05 : Structures chimiques	91
Annexe 06 : Schémas.....	92

Introduction

Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) sont des bactéries Gram négatif, commensales du tractus gastro-intestinal des humains et de nombreuses espèces animales, telles que les volailles. Cependant, certaines souches sont pathogènes, elles sont subdivisées en souches à tropisme intestinal (IPEC) et en souches à tropisme extra-intestinal (ExPEC) (MAINIL *et al.*, 2003 ; AGABOU *et al.*, 2015 ; LI *et al.*, 2015 ; VIDIC *et al.*, 2017).

La capacité d'*E.coli* à provoquer des infections extra-intestinales dépend largement de plusieurs facteurs de virulence nécessaires pour sa survie dans un nouvel environnement et concurrencer avec succès la microflore normale de l'hôte pour les nutriments essentiels (AL-SAIEDI et AL-MAYAH, 2014 ; VAISH *et al.*, 2016).

Les ExPEC sont subdivisés en plusieurs pathovars sur la base de plusieurs critères. Certains de ces pathovars sont nommés en fonction de leurs hôte, tel que *E. coli* pathogène d'origine aviaire (APEC) (MAINIL, 2013 ; CUNHA *et al.*, 2014 ; CUNHA *et al.*, 2017 ; RONCO *et al.*, 2017 ; STROMBERG *et al.*, 2017). Ces derniers sont considérés comme un groupe hétérogène d'agents pathogènes présentant une large gamme de caractéristiques de virulence dont : les adhésines (ou fimbriae de type 1 et P) impliquées dans l'adhérence des bactéries aux tissus épithéliaux ; la résistance au sérum nécessaire à la survie des bactéries dans le sang ; les toxines comme l'hémolysine et la cytotoxine nécrosante dont l'effet est de favoriser le franchissement de la barrière épithéliale par les colibacilles ; l'hémagglutinine sensible à la température (*Tsh*) ; le système aérobactine qui permet la captation de fer et enfin la fixation du rouge Congo au polysaccharide capsulaire (MAINIL, 2003 ; MELLATA, 2003 ; DZIVA et STEVENAS, 2008 ; ROBINEAU et MOALIC, 2010).

Les APEC sont les agents étiologiques de la colibacillose. Il s'agit d'un syndrome complexe caractérisé par de multiples infections locales et systémiques, fréquemment associé à la mort subite, l'aérosacculite, la péricardite, la périhépatite, la salpingite, la cellulite et à la réduction du rendement, de la qualité et de l'éclosion des œufs (EWERS *et al.*, 2003 ; SADEYEN *et al.*, 2014 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015 ; BORGES *et al.*, 2016).

L'exposition des volailles aux agents pathogènes et au stress augmenterait l'incidence de la colibacillose (HAMMOUDI *et al.*, 2009 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015). Pour y remédier, une utilisation accrue des antibiotiques a été observée dans diverses activités agricoles, en particulier dans les élevages avicoles, où les antibiotiques sont utilisés à des fins préventifs, curatifs ou encore comme promoteur de croissance. Cette utilisation exagérée et incontrôlée a conduit au développement de souches bactériennes résistantes. Ceci est d'autant

Introduction

plus préoccupant qu'un déclin du nombre d'antibiotiques efficaces pour l'usage humain et animal a été signalé (MACIEL *et al.*, 2017 ; SALMAN *et al.*, 2017). Les divers mécanismes de résistance et de transfert de gènes aussi bien horizontal que vertical ont abouti à l'émergence de multirésistances (DA SILVA et MENDONÇA, 2012).

La sélection de ces bactéries résistantes (voir multirésistantes) aux antimicrobiens pourrait jouer un rôle épidémiologique dans la propagation de la résistance entre les hôtes animaux et les humains, soit par contact direct, soit par consommation d'aliments contaminés. La transmission inter-hôte est plus susceptible de se produire dans les zones rurales des pays en développement, comme certaines régions d'Afrique, où les gens vivent souvent en contact étroit avec les animaux d'élevage (ALONSO *et al.*, 2017).

L'interaction entre la résistance aux antimicrobiens et la virulence est faiblement comprise (DA SILVA et MENDONÇA, 2012). DENAMUR et PICARD (2012) supposent que, si le support génétique de la résistance et la virulence est le même, ils pourraient être co-mobilisés d'une cellule à une autre. Cependant, BECEIRO *et al.* (2013) présumant que la relation entre la virulence et la résistance est antagoniste (inverse), la présence de gène de résistance aux antimicrobiens provoque la perte partielle ou totale de traits de virulence.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui comporte deux volets : la détermination des profils d'antibiorésistance de souches d'APEC issues majoritairement de lésions de colibacillose isolées de la région du centre Algérien et la recherche phénotypique, chez ces souches, de trois facteurs de virulence (la résistance au sérum, la fixation au rouge Congo et l'hémolysine).

La finalité poursuivie est de déterminer une éventuelle corrélation entre les profils d'antibiorésistances et la présence de facteurs de virulence chez des souches d'APEC locales.

Étude bibliographique

Généralités sur *Escherichia coli*

1. Généralités sur *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) est l'une des espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées de la flore intestinale commensale des animaux à sang chaud, coexistant pacifiquement avec un bénéfice mutuel pour le microorganisme et l'hôte (LAAREM *et al.*, 2017). Cependant, les clones d'*E.coli* hautement adaptés ont acquis un répertoire de facteurs de virulence qui permet la colonisation et la survie au sien de l'hôte, entraînant éventuellement des maladies, locales ou systémiques, graves telle que la colibacillose (MAINIL, 2013 ; VAISH *et al.*, 2016 ; ABREU et BARBOSA, 2017). Il est responsable des taux élevés de morbidité et de mortalité dans le monde entier (CUNHA *et al.*, 2017).

1.1. Historique

En 1885, *E.coli* a été décrite par le pédiatre allemand Theodor ESCHERICH (1857-1911) dans les excréments d'un enfant souffrant de diarrhée et il l'a nommée *Bacterium coli* commune (MAINIL, 2013).

Le vétérinaire DANISH a supposé en 1893, que cette espèce comprend différentes souches, certaines étant pathogènes, d'autres non pathogènes (MAINIL, 2013).

En 1919, CASTELLANI et CHALMERS donna un nom définitif à cette bactérie qui est *Escherichia coli* en hommage à ESCHERICH (MAINIL, 2013).

Dans les années 40, KAUFFMANN a développé le sérotypage d'*E.coli*. Il a mis en évidence la présence des antigènes de surface somatiques (antigènes O), antigènes capsulaires (antigènes K) et antigènes flagellaires (antigènes H). Certains sérotypes sont en effet associés à des syndromes cliniques spécifiques (MAINIL, 2013).

Depuis 1960, plusieurs propriétés spécifiques qui différencient les souches d'*E.coli* pathogènes des souches non pathogènes ont été développées (MAINIL, 2013).

1.2. Les caractéristiques bactériologiques de l'espèce

1.2.1. Les caractères morphologiques

E. coli est un bacille de forme cylindrique (bâtonnet) ou coccobacillaire, de 2 à 3 µm de longueur et 0,6 µm de largeur, à Gram négatif, mobile grâce à une ciliature péritriche, non sporulé, encapsulé. Les colonies développées par cette bactérie ont un aspect bombé, lisse, homogène, ronde à bord régulier et de 2 à 3 mm de diamètre (JOLY et REYNAUD, 2002 ; VAISH *et al.*, 2016).

1.2.2. Les caractères cultureux

La recherche des *E.coli* est couramment effectuée dans des circonstances variées. Une culture sur milieu ordinaire est facilement réalisable, compte tenu du fait qu'ils n'ont pas d'exigences particulières pour sa multiplication. Ils sont caractérisés par une croissance rapide à 37°C avec un temps de génération de 20 minutes (JOLY et REYNAUD, 2002).

1.2.3. Les caractères biochimiques

Selon la clef d'identification des entérobactéries de LE MINOR et VIRON (1982), *E.coli* possède un ensemble de caractères biochimiques discriminants, ce qui permet de la différencier d'une population microbienne hétérogène.

E.coli a la capacité de fermenter divers sucres (glucose, le lactose, mannitol et saccharose pour certaines souches) avec production d'acides organiques. Lors de la fermentation du glucose, il y a production de gaz. L'un des caractères discriminant d'*E.coli* est la production de l'indole à partir du tryptophane. Il est aéro-anaérobie facultatif, uréase négatif, tryptophane désaminase négatif, ne produit pas d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer négative) et n'utilise pas le citrate comme source de carbone. Il réduit les nitrates en nitrites, n'a pas d'oxydase mais possède une catalase (JOLY et REYNAUD, 2002).

1.2.4. Les caractères antigéniques

Selon la classification antigénique attribuée aux entérobactéries, *E.coli* possède des antigènes variés associés à quatre types de structure (JOLY et REYNAUD, 2002 ; VAISH *et al.*, 2016):

- Les antigènes somatiques O : sont associés aux lipopolysaccharides de la paroi.
- Les antigènes flagellaires H : sont associés aux protéines des flagelles.
- Les antigènes capsulaires K : sont de nature polysaccharidique.
- Les antigènes de l'enveloppe de type F : sont présents chez les souches ayant les propriétés d'adhésion. Ils sont souvent associés aux fimbriae ou aux pili et sont donc des structures fibrillaires, ce qui explique la désignation F.

La détermination du sérotype de chaque souche est utile dans les enquêtes épidémiologiques et pour caractériser les souches pathogènes (JOLY et REYNAUD, 2002).

1.3. Classifications

1.3.1. Classification selon Bergy's

La classification d'*E. coli* selon la seconde Edition de Bergey's of Systematic bacteriology (2004) est la suivante :

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Gammaproteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Escherichia*

Espèce : *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* comprend cinq espèces : *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanni*, *E. vulneris* (JOLY et REYNAUD, 2002).

1.3.2. Classification selon les pathotypes

Les *Escherichia coli* pathogènes sont subdivisés en souches à tropisme intestinal et en souches à tropisme extra-intestinal, sur la base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques responsables de leur pouvoir pathogène (MAINIL, 2003).

1.3.2.1. Les *E. coli* pathogènes intestinales (IPEC)

Les *E. coli* pathogènes intestinales ou entériques sont les *E. coli* qui se manifestent seulement au niveau des intestins. Elles sont subdivisées en plusieurs pathovars, nommés par le nom du syndrome clinique qu'ils peuvent provoquer : les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) et les *E. coli* entéro-agrégative (EAEC) (MAINIL, 2013).

1.3.2.2. Les *E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC)

L'*Escherichia coli* pathogène extra-intestinale (ExPEC) est un groupe spécifique d'*E. coli* qui cause un spectre diversifié d'infections invasives sur de multiples sites anatomiques chez les animaux et les humains (KARIYAWASAM *et al.*, 2007).

Les différentes souches ExPEC sont subdivisées en plusieurs pathovars, sur la base de plusieurs critères, tels que : le nom de l'hôte qu'ils les hébergent, le site de l'infection, ou bien la maladie qu'ils peuvent engendrer (MAINIL, 2013 ; CUNHA *et al.*, 2014 ; CUNHA *et al.*, 2017 ; RONCO *et al.*, 2017 ; STROMBERG *et al.*, 2017) : les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* causant une méningite néonatale (NMEC), les *E. coli*

associés à la septicémie (SEPEC), les *E.coli* necrotoxigénique (NTEC), les *E.coli* verotoxigénique (VTEC) et les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC).

1.4. Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) et la colibacillose

1.4.1. Les APEC

L'*Escherichia coli* pathogène aviaire (APEC) est l'agent étiologique de la colibacillose chez les oiseaux de production et même chez les oiseaux sauvages. Selon la virulence de la souche infectante, les lésions locales peuvent devenir systémiques et culminer dans la colisepticémie (ANTAO *et al.*, 2008 ; JOHNSON *et al.*, 2008 ; CUNHA *et al.*, 2017).

Les APEC constituent une population génétiquement diverse (hétérogène) avec de nombreux sérogroupes et types de séquences (ST) différents. Les principaux sérogroupes observés chez les APEC comprennent O1, O2 et O78 (LA RAGIONE et WOODWARD, 2002 ; CUNHA *et al.*, 2017 ; RONCO *et al.*, 2017).

1.4.2. La colibacillose

Chez les volailles, les souches APEC provoquent une large gamme d'infections localisées et systémiques, communément appelées colibacillose aviaire.

1.4.2.1. Définition

La colibacillose aviaire est un syndrome complexe caractérisé par de multiples lésions organiques ; ce sont les infections bactériennes les plus fréquentes chez les volailles. Elles peuvent être schématiquement classées en colibacilloses primaires dues à des colibacilles spécifiquement pathogènes et des colibacilloses secondaires, suite à une immunodépression causée par une infection virale ou bactérienne (mycoplasme) (EWERS *et al.*, 2003 ; ROBINEAU et MOALIC, 2010 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

1.4.2.2. Développement de l'infection

Suite à l'inhalation de poussières contaminées, où les niveaux peuvent atteindre jusqu'à 10^6 cellules d'*E.coli* viables par gramme, dans les élevages de volailles ; une première multiplication au niveau du tractus respiratoire supérieur, les bactéries colonisent les voies respiratoires profondes à savoir les sacs aériens et les poumons, causant une airsacculite (SADEYEN *et al.*, 2014).

Le mode de translocation des APEC des voies respiratoires vers le flux sanguin est mal défini (SADEYEN *et al.*, 2014). Cependant, d'après ANTÃO (2008), leurs sites d'entrées dans la circulation sanguine sont présumés être la région d'échange de gaz du poumon et les

sacs d'air, qui sont préalablement vulnérabilisés par la colonisation et l'invasion de ces bactéries. En conséquence, une bactériémie est induite 3 heures après avoir quitté les poumons.

Au stade final de l'infection, les APEC colonisent les organes internes causant la périhépatite, la péricardite, la salpingite, l'omphalite, le coligranulome, la cellulite, le syndrome de la tête gonflée et la septicémie (STORDEUR et MAINIL, 2001 ; CUNHA *etal.*, 2014).

1.4.2.3. Prophylaxie

La prophylaxie de la colibacillose repose sur un contrôle strict des conditions de reproduction, du respect des pratiques de biosécurité et de la vaccination (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Généralités sur les antibiotiques

2. Généralités sur les antibiotiques

2.1. Définitions

En 1942, WAKSMAN donna le nom d'antibiotique à toutes les substances, possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. Cependant, le mot même « antibiotique » (du grec *anti* signifiant « contre » et *bios* « la vie ») fut créé en 1889 par Paul VUILLEMIN, qui proposa également le terme « antibioté » pour les microorganismes qui provoquent l'antibiose (BRYSKIER, 1999).

Les antibiotiques sont donc des médicaments qui permettent de lutter efficacement contre des infections bactériennes, agissant de manière spécifique, en bloquant une des étapes essentielle à leur survie ou à leur multiplication (CHARDON et BRUGERE, 2014).

2.2. Classification des antibiotiques

Plusieurs classifications sont attribuées aux antibiotiques.

2.2.1. Selon la nature chimique

2.2.1.1. Les bêta -lactamines

Les bêta-lactamines sont une grande classe d'antibiotiques qui ont un noyau bêta-lactame dans leur structure moléculaire. Ils sont les antibiotiques les plus utilisés et comprennent quatre groupes de molécules : les pénames, les pénèmes, les céphèmes et les monolactames. On doit ajouter les inhibiteurs de bêta-lactamases, dont certaines structures sont incluses dans les quatre principaux groupes (BRYSKIER, 1999 ; BECEIRO *et al.*, 2013). La structure de base des β -lactamines est un noyau carbonyl lactame. Il est indispensable pour l'activité de ces molécules. Les différents groupes de cette classe se distinguent en fonction du radical fixé à cette structure (voir figure 01) (BRYSKIER, 1999) :

- La fixation d'un cycle penta-atomique saturé correspond aux pénames (voir Annexe 05) ;
- La fixation d'un cycle penta-atomique insaturé correspond aux pénèmes (voir Annexe 05) ;
- La fixation d'un cycle hexa-atomique correspond aux céphèmes ;
- Le dernier groupe comporte uniquement le noyau lactame se sont les monobactames, ensuite renommé monolactames.

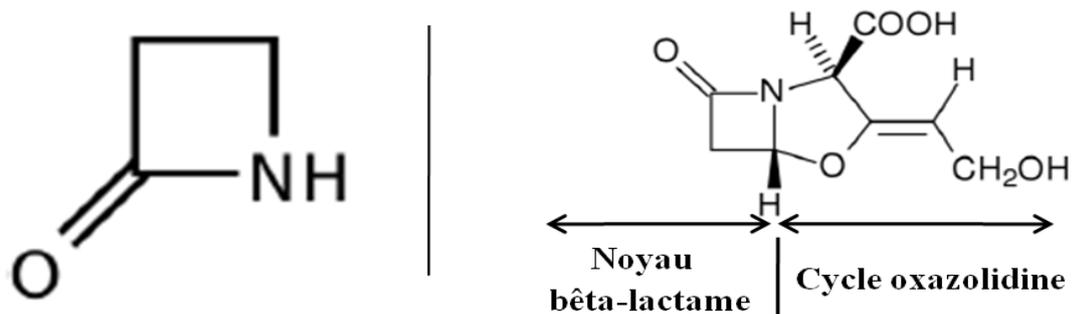


Figure 01: Le noyau bêta-lactame (à gauche) ; Structure chimique de l'acide clavulanique (à droite) (BEN YOUSSEF *et al.*, 2016).

2.2.1.2. Les aminosides

Les aminosides aussi nommés aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques. Leur structure de base commune comportent un aminocyclitol, auquel se lie par ponts glycosidiques deux (ou exceptionnellement trois) oses (voir figure 02) (VAN BAMBEKE *et al.*, 2008).

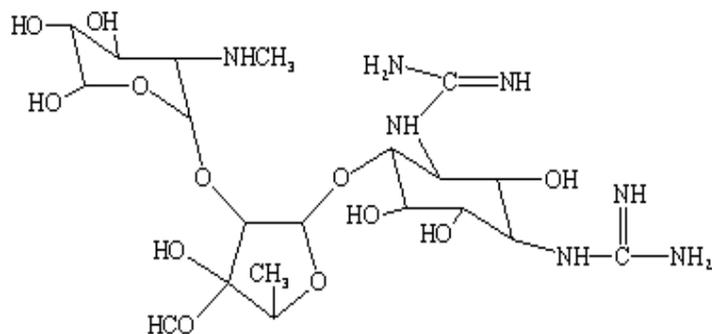


Figure 02 : Structure de la streptomycine (ANONYME 01).

2.2.1.3. Les quinolones et fluoroquinolones

Les quinolones sont des composés antibactériens de synthèse. Les molécules appartenant à cette famille possèdent toutes un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué. Ils présentent une fonction cétone en position 4 et un groupement carboxylique en position 3. Ce cycle est accolé à un autre cycle aromatique variable : benzène, pyridine, pyrimidine. La première quinolone à avoir été découverte est l'acide Nalidixique, en 1962 par LESHER et ses collaborateurs (voir figure 03) (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Les fluoroquinolones se caractérisent par la présence d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine en position 7 (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

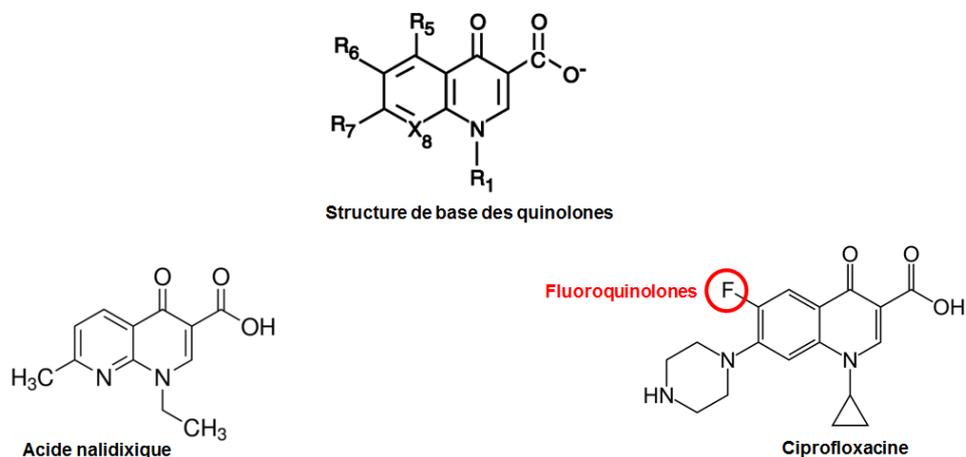


Figure 03: Structure des quinolones et fluoroquinolones (ANONYME 02).

2.2.1.4. Les tétracyclines

Les cyclines ont une structure polycyclique complexe constituée de 4 cycles, dont un cycle aromatique et 3 autres cycles comprenant des carbones saturés. La première cycline : chlortétracycline, dont dérive la tétracycline, a été isolée en 1944 de *Streptomyces aureofaciens* par B.M. DUGGAR (voir figure 04) (BRYSKIER, 1999 ; COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

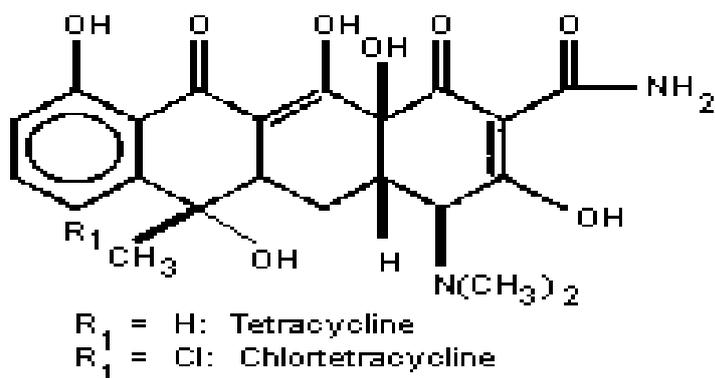


Figure 04 : Structures chimiques des tétracyclines et chlortétracycline (ANONYME 03).

2.2.1.5. Les polymyxines

Les polymyxines sont des lipopeptides cycliques ; il s'agit d'un décapeptide dont la chaîne grasse est fixée sur le noyau peptidique. Elles ont été isolées en 1947 à partir de la fermentation du *Bacillus polymyxa* (voir figure 05) (BRYSKIER, 1999).

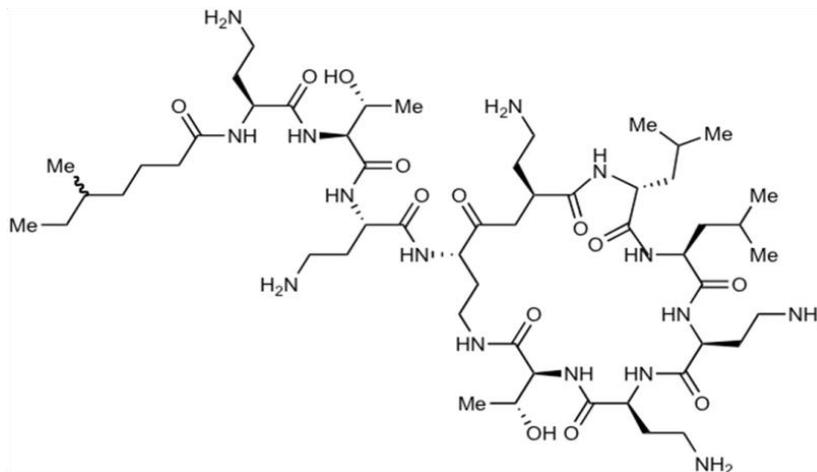


Figure 05 : Structures chimique de la colistine A (polymyxine E) (ANONYME 04).

2.2.1.6. Les sulfamide-triméthoprimes

2.2.1.6.1. Les sulfamides

Les sulfamides sont des dérivés de l'acide para-aminobenzène sulfonique, dans lesquels sont indispensables à l'activité antibactérienne, la présence d'une fonction amine libre et d'un soufre substituant directement le benzène (VAN BAMBEKE *et al.*, 2008).

2.2.1.6.2. Letriméthoprime

Le triméthoprime est un diamino-pyrimidine. Il a été synthétisé en 1961 par HITCHINGS et BUSHBY. Bien qu'utilisé parfois seul, il doit être associé aux sulfamides (voir figure 06) (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

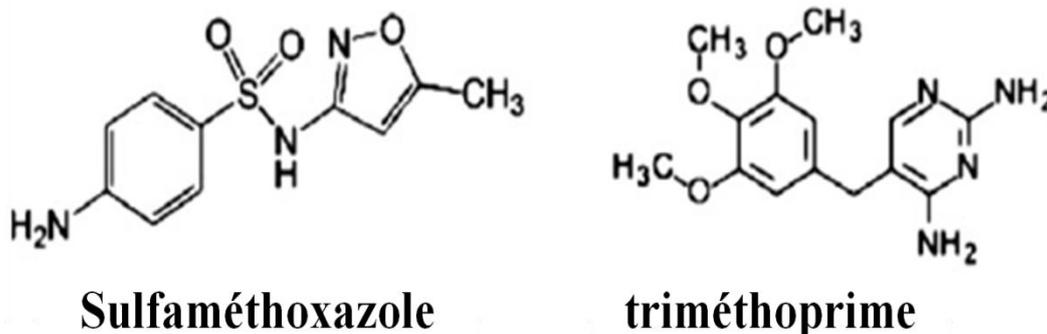


Figure 06 : Structures chimique du sulfaméthoxazole et triméthoprime (ANONYME 05).

2.2.2. Classification selon l'origine

Selon CHARDON et BRUGERE (2014), les antibiotiques ont trois origines :

Les antibiotiques naturels sont produits par des micro-organismes, soit par des champignons microscopiques (ex : la pénicilline produite par *Penicillium*, céphalosporine produite par *Céphalosporium acremonium*) soit par des bactéries (ex : streptomycine produite par *Streptomyces*).

Les antibiotiques synthétiques se sont des produits obtenus entièrement par voie chimique (ex : les quinolones).

Les antibiotiques semi-synthétiques qui sont obtenus en insérant un radical chimique dans une structure moléculaire naturelle (ex : la méticilline).

2.2.3. Classification selon leur spectre d'action

Le spectre d'action ou d'activité est propre à chaque antibiotique, et peut varier dans le temps à la suite de l'apparition de nouvelles résistances chez les différentes espèces bactériennes. Il y a des antibiotiques à large spectre d'activité comme la tétracycline, qui est aussi bien actif sur les bactéries Gram positifs que négatifs mais également sur d'autres microorganismes (les chlamydia, les mycoplasmes et les rickettsies) et mêmes sur certains protozoaires. D'autres antibiotiques dont le spectre d'activité est étroit, par exemple les quinolones (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

2.2.4. Classification selon l'effet antibactérien

Les antibiotiques peuvent être soit bactéricides soit bactériostatiques.

La bactériostase : c'est l'effet bactériostatique de certains antibiotiques, tels que les tétracyclines. En présence de ces molécules, la croissance bactérienne est ralentie mais n'entraîne pas la mort cellulaire (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

La bactéricidie : c'est l'effet bactéricide de certains antibiotiques, tels que les bêta-lactamines, aminosides et les quinolones. L'activité de ces antibiotiques entraîne la mort des bactéries y sont ils sensibles (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

2.2.5. Selon les sites d'action

Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises. Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles moléculaires spécifiques, le plus souvent intracellulaires (COURVALIN et LECLERCQ, 2012). Selon la cible des

antibiotiques une classification a été établie (BRYSKIER, 1999 ; COURVALIN et LECLERCQ, 2012):

- Les antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi : les bêta-lactamines ;
- Les antibiotiques agissant sur la réplication / la transcription de l'ADN : sulfamides, triméthoprime, quinolones ;
- Les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique : aminosides, tétracyclines ;
- Les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique : les polymyxines.

2.3.Mécanismes d'action des antibiotiques(voir figure 08)

2.3.1. Les bêta-lactamines

L'enveloppe des entérobactéries comprend, de l'extérieur vers l'intérieur : la membrane externe, la paroi (peptidoglycane) et la membrane cytoplasmique. Les cibles des bêta-lactamines sont des protéines, situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique, appelées « protéines de liaison aux pénicillines : PLP ». Ces protéines catalysent des réactions de transglycosylation et/ou de transpeptidation : la première permet de relier les saccharides et les peptides entre eux, aboutissant à la formation de longues chaînes polysaccharidiques linéaires. La seconde permet d'incorporer les chaînes polysaccharidiques néo-synthétisées au peptidoglycane préexistant (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Les bêta-lactamines inhibent une étape nécessaire à la réticulation du peptidoglycane : la transpeptidation. En effet, elles présentent une analogie structurale avec le dipeptide D-Alanine-D-Alanine, qui constitue le substrat naturel des PLP. De ce fait, elles se comportent comme des substrats suicides de ces enzymes. Donc, l'antibiotique se lie au site actif des PLP pour former un complexe pré-covalent, puis le cycle bêta-lactame s'ouvre pour former une liaison covalente irréversible avec la sérine active de la poche catalytique des PLP, entraînant l'inhibition des PLP, ce qui est traduit par un arrêt de la synthèse du peptidoglycane (BRYSKIER, 1999 ; COURVALIN et LECLERCQ, 2012). L'enveloppe externe est alors fortement fragilisée. La bactérie devient très sensible aux stress extérieurs (pression osmotique, température, stress mécanique) provoquant ainsi la lyse cellulaire (CHARDON et BRUGERE, 2014).

2.3.2. Les aminosides

Les aminosides inhibent la synthèse protéique en agissant sur les ribosomes. Ils se fixent sur la petite sous-unité des ribosomes (30S), au niveau du site du décodage des codons, empêchent la traduction de l'ARNm et conduisent à des erreurs de lecture du code génétique.

Cela empêche la formation de nouvelles protéines et par conséquent la multiplication des bactéries (voir figure 08) (CHARDON et BRUGERE, 2014).

2.3.3. Les quinolones

Les quinolones exercent une inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse : l'ADN topo-isomérase de type II ou l'ADN gyrase et l'ADN topo-isomérase IV (voir figure 08).

L'ADN gyrase est responsable du surenroulement de l'ADN lors de la réplication. Selon COURVALIN et LECLERCQ (2012), plusieurs quinolones se lieraient d'une manière coopérative à l'ADN dans une zone où les deux brins ont été coupés par la gyrase, aboutissant à la formation d'un complexe ternaire irréversible entre l'ADN-la gyrase-quinolones. Le blocage de l'enzyme sur l'ADN empêcherait la progression de l'ADN polymérase bactérienne.

La topo-isomérase IV semble avoir un rôle spécifique dans le désenchevêtrement des chromosomes au cours de la division cellulaire. L'interaction entre les quinolones et la topo-isomérase IV stimulerait la coupure de l'ADN et inhiberait la religation (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Les quinolones étant des antibiotiques bactéricides, d'autres mécanismes doivent aussi entrer en jeu. Ainsi, ces molécules engendrent des coupures non réparables au niveau de l'ADN double brin, capables de déclencher l'activation de certaines synthèses protéiques, responsables de la bactéricidie (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

2.3.4. Les tétracyclines

Les tétracyclines pénètrent dans l'espace périplasmique à travers les porines. Chez les *E.coli*, les porines majeurs sont les OmpF (Protéine outer membrane F). Le passage des tétracyclines à travers la paroi (riche en lipopolysaccharide) dépend de leurs degrés de liposolubilité. Puis, elles traversent la membrane cytoplasmique à la fois par diffusion passive et par transport actif. Après avoir traversé toutes les membranes obstacles, l'antibiotique diffuse dans le cytoplasme et atteint sa structure cible : les ribosomes (voir figure 08) (BRYSKIER, 1999).

Les tétracyclines sont des inhibiteurs de la synthèse protéique. Le site de fixation de ces molécules est la sous-unité 30S du ribosome. L'interaction codon-anticodon entre l'ARNt et l'ARNm est perturbée, ce qui bloque la phase d'élongation ; c'est-à-dire, l'attachement du complexe ARNt-aminoacyl au site A du ribosome (BRYSKIER, 1999 ; COURVALIN et

LECLERCQ, 2012). La fixation des tétracyclines sur leurs cibles est réversible, ce qui expliquerait leur caractère bactériostatique (BRYSKIER, 1999).

2.3.5. Les polymyxines

Les polymyxines interagissent avec les lipides membranaires et désorganisent la bicouche phospholipidique de la membrane cytoplasmique, perturbant ainsi son intégrité. Des constituants intracellulaires, tels que les métabolites et ions, fuient en dehors de la cellule, provoquant ainsi la mort de la bactérie (voir figure 08) (BRYSKIER, 1999 ; CHARDON et BRUGERE, 2014).

2.3.6. Les sulfamides et le triméthoprime

Les sulfamides et le triméthoprime interfèrent la synthèse des acides nucléiques, ainsi la synthèse des protéines (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Ces deux antibiotiques interviennent dans la voie de synthèse des thymines (T). Les principales cibles de ces molécules sont les dérivés des folates (Vitamine B9), notamment le dihydrofolate et le tétrahydrofolate, ayant un rôle essentiel dans les réactions de synthèse de cette base azotée. Les sulfamides sont des analogues structurels de l'acide p-aminobenzoïque ou PABA, l'un des éléments qui intervient dans la synthèse du dihydrofolate. Le triméthoprime intervient en aval dans la voie, en inhibant la synthèse de tétrahydrofolate par la dihydrofolate réductase (voir figure 07 et 08).

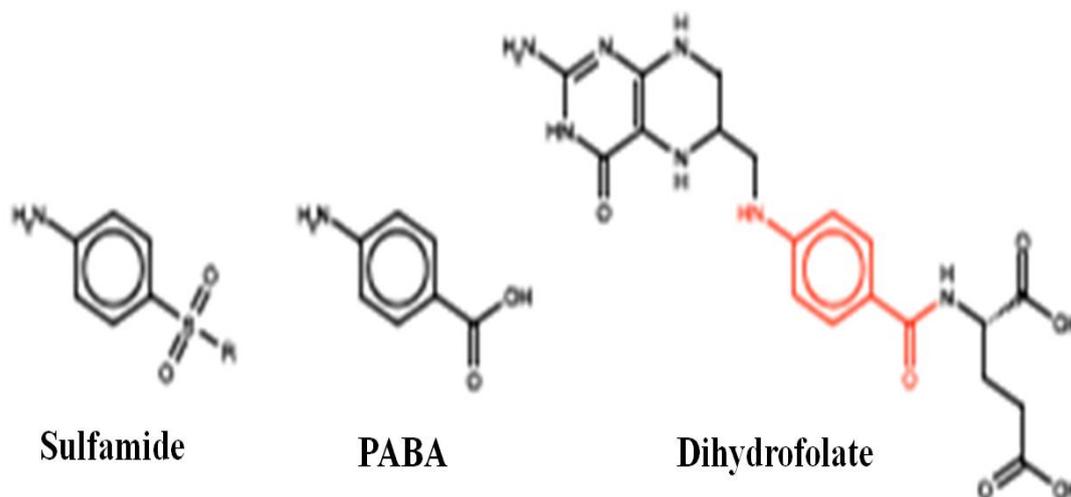


Figure 07 : Structure chimique du sulfamide et son analogue de structure PABA, un précurseur de synthèse des folates (BEN YOUSSEF *et al.*, 2016).

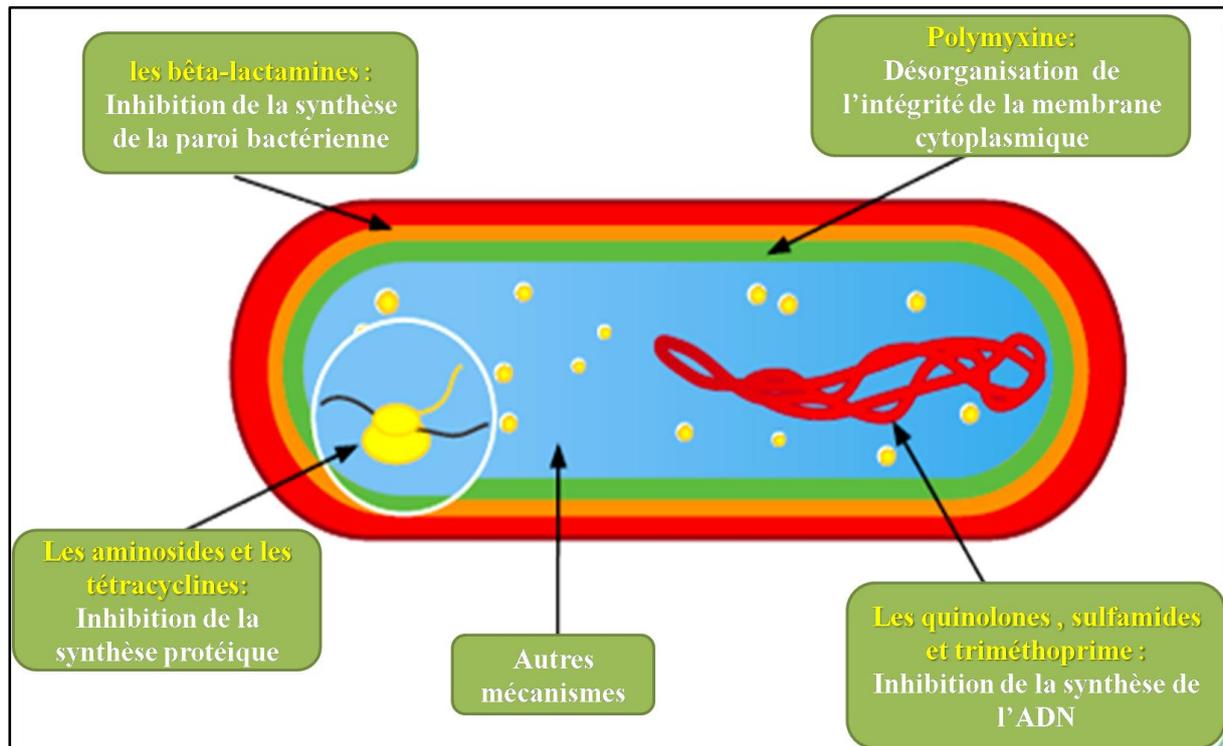


Figure 08 :les différents mécanismes d'actions des antibiotiques (CHARDON et BRUGERE, 2014).

2.4. L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire

Comme tout être vivant, les animaux sont sujets à des maladies, qu'il est nécessaire de prévenir ou de traiter. En 2001, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé qu'au moins 50% des antibiotiques produits dans le monde étaient destinés aux animaux d'élevage et de compagnie. Les antibiotiques peuvent être utilisés de trois manières différentes avec des objectifs variables : curatif, préventif et comme promoteur de croissance (CHARDON et BRUGERE, 2014).

Depuis les années cinquante, les antibiotiques sont utilisés en élevage comme médicaments vétérinaires, à des fins soit thérapeutique soit zootechnique (MARTEL et CHASLUS-DANCLA, 2000). Les antibiotiques ont tout d'abord une utilisation thérapeutique, visant l'éradication d'une infection présente (curative) ou la prévention d'une infection contagieuse déclarée (métaphylactique) (MARTEL et CHASLUS-DANCLA, 2000 ; CHARDON et BRUGERE, 2014). L'incorporation de faibles doses d'antibiotique dans les aliments stimule la croissance des animaux, afin d'augmenter de façon importante la rentabilité des élevages, c'est la zootechnique (MARTEL et CHASLUS-DANCLA, 2000).

La résistance aux antibiotiques

3. La résistance aux antibiotiques

Lorsqu'une population de bactéries est soumise à l'action d'un antibiotique dans son milieu, elle subit une pression de sélection, qui favorise les cellules qui sont les plus aptes à résister à l'effet de ces molécules. Ce phénomène est connu sous le nom de résistance bactérienne. À ce jour, certains d'antibiotiques ne sont déjà plus efficaces contre certaines espèces bactériennes (CHASLUS-DANCLA, 2001).

3.1. Définition de la résistance

L'évolution des bactéries vers la résistance aux agents antimicrobiens, y compris les antibiotiques, est inévitable car elle représente un aspect particulier de l'évolution générale de ces micro-organismes (EBONGUE *et al.*, 2015 ; COURVALIN, 2016 ; DOI *et al.*, 2017). La résistance antimicrobienne se réfère à la capacité d'un micro-organisme à résister à l'activité bactériostatique / bactéricide d'un agent antibactérien (BECEIRO *et al.*, 2013 ; LABRO et BRYSKIER, 2014).

3.2. Le support génétique de la résistance

3.2.1. La résistance naturelle

La résistance est dite naturelle, si toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique ; ceci sous-entend que ces souches bactériennes ont manifesté d'emblée un phénomène de résistance, avant toute pression sélective, en exprimant une propriété innée (le phénotype sauvage). Par exemple : les mycoplasmes qui n'ont pas de paroi, ce qui les rend insensibles aux bêta-lactamines, ce type de résistance est rencontré chez les souches n'ayant jamais été en contact avec un antibiotique (BRYSKIER, 1999 ; CARLE, 2009 ; CHARDON et BRUGERE, 2014).

3.2.2. La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsqu'un individu d'une population de bactéries normalement sensibles devient résistant. C'est le résultat d'une modification génétique : mutation de gène endogène ou acquisition d'un gène exogène. Ce type de résistance se manifeste sous l'effet d'une pression de sélection, permettant ainsi aux bactéries ayant acquis cette résistance de se multiplier en présence de l'antibiotique (BRYSKIER, 1999 ; CARLE, 2009 ; CHARDON et BRUGERE, 2014).

3.2.2.1. Par mutation de gène endogène spontanément

L'apparition de la résistance est en général la conséquence d'une mutation spontanée qui apparaît dans le chromosome, en introduisant des substitutions d'acides aminés ou de bases nucléiques dans les cibles moléculaires, leur faisant ainsi perdre leur affinité pour les antibiotiques. De nombreux exemples de ce type de mécanismes ont été rapportés dans la littérature pour différentes familles d'antibiotiques. Par exemple : la sensibilité aux bêta-lactamines peut être diminuée par des mutations ou des réarrangements génétiques touchant les PLP. La résistance chromosomique n'est pas facilement transférable à une autre cellule, faute de mécanisme spécifique de transfert (COURVALIN et LECLERCQ, 2012 ; CHARDOU et BRUGERE, 2014).

3.2.2.2. Par transfert horizontal de gènes (HGT)

Le transfert horizontal de gènes joue un rôle clé dans l'évolution des bactéries et la propagation des gènes de résistance aux antimicrobiens. Les supports de gènes de résistance aux antibiotiques sont multiples tels que les plasmides, les transposons ou les intégrons, qui sont des éléments génétiques mobiles pouvant donc être transférés à différentes souches ou espèces bactériennes (COURVALIN et LECLERCQ, 2012 ; DA SILVA et MENDONÇA, 2012 ; COURVALIN, 2016).

3.3. Transmission de la résistance

Il existe trois mécanismes de transfert d'ADN qui permettent la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques : la transformation (capture de l'ADN libre), la transduction (via le bactériophage) ou la conjugaison (DA SILVA et MENDONÇA, 2012 ; CHARDOU et BRUGERE, 2014).

3.3.1. La conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne est un mécanisme de transfert d'ADN actif très efficace. Souvent, plusieurs gènes de résistance sont regroupés sur le même plasmide en plus des gènes de transfert (facteur F) permettant ainsi le transfert et la propagation rapide de cette résistance (voir figure 09) (COURVALIN et LECLERCQ, 2012 ; CHARDOU et BRUGERE, 2014).

Ce transfert est un processus par lequel la bactérie donatrice émet ou exprime un canal, sorte de filament creux au travers duquel l'ADN à transférer, est injecté dans la cellule réceptrice.

3.3.2. La transformation

La transformation correspond à la capacité qu'ont certaines bactéries dites compétentes à capter de l'ADN nu exogène, suite à la lyse de bactéries, présent dans son environnement et à l'intégrer dans leur génome par recombinaison entre régions homologues. Ce mécanisme d'échange génétique est peu fréquent du fait que seules quelques espèces bactériennes pathogènes sont naturellement compétentes (voir figure 09) (COURVALIN et LECLERCQ, 2012 ; CHARDOU et BRUGERE, 2014).

3.3.3. La transduction

Il s'agit d'un transfert d'ADN bactérien partiel, par l'intermédiaire de bactériophages dont le rôle est passif (vecteur). Lors de la phase d'encapsidation, il incorpore des gènes supplémentaires bactériens qui pourront être transférés dans une autre bactérie. Ce système est efficace ; cependant, la petite taille du génome des bactériophages (approximativement de 40kb) limite la taille et le type des fragments qui peuvent être incorporés (voir la figure 09) (CARRIERE, 2007 ; COURVALIN et LECLERCQ, 2012 ; CHARDOU et BRUGERE, 2014).

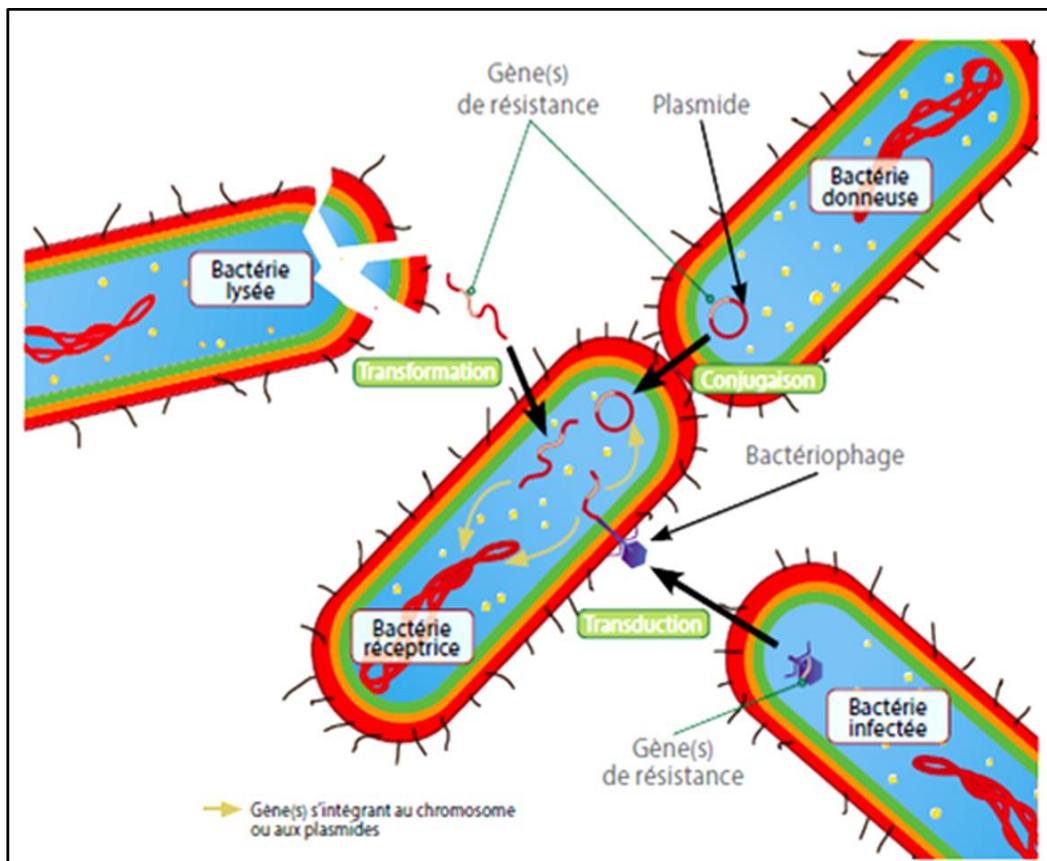


Figure 09 : Les différents mécanismes de transfert horizontal des gènes de résistance (CHARDOU et BRUGERE, 2014).

L'accumulation régulière de gènes, endogènes et exogènes au sien d'un même génome, codant pour ces différents mécanismes de résistance peut entraîner une résistance à haut niveau ; parfois la résistance à un antibiotique confère une résistance à un autre antibiotique : il s'agit de la résistance croisée aboutissant ainsi à l'apparition des multirésistances (CARLE, 2009 ; COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Ces bactéries résistantes (voir multirésistantes) sont ensuite transmises entre les différents hôtes, ce soit par contact direct ou indirect. Le schéma d'EWERS *et al.* (2012) ci-dessous illustre les détails de cette transmission.

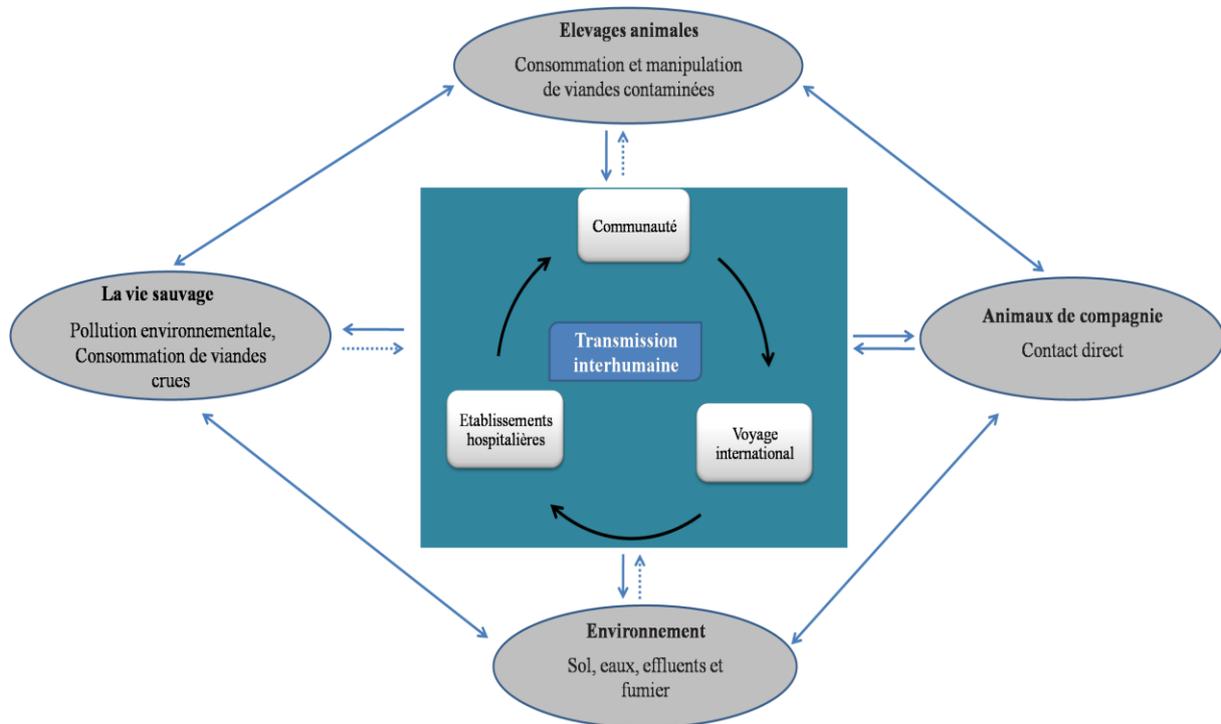


Figure 10 : Schéma illustrant les différentes voies de transmission probables de l'antibiorésistance (EWERS *et al.* 2012).

3.4. Mécanisme de résistance

Les bactéries ont démontré leur capacité à croître leurs résistances aux antibiotiques par une multitude de mécanismes (COURVALIN et LECLERCQ, 2012). Les principales stratégies utilisées sont décrites ci-dessous et illustrées dans la figure 12:

3.4.1. Les mécanismes de résistance aux bêta-lactamines

Il existe quatre mécanismes de résistance vis-à-vis des bêta-lactamines. Ces derniers sont détaillés ci-dessous (voir figure 12).

3.4.1.1. β -lactamases

Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines observé chez les entérobactéries est la production d'enzyme inactivatrice : les β -lactamases, ce sont des protéases de type sérine, qui se lient aux β -lactamines de façon covalente, entraînant l'ouverture de leurs cycles β -lactames au niveau de la liaison amide (voir figure 10), suite à l'activation d'une molécule d'eau, donnant ainsi un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide aminé inactif. Il existe une grande variété de β -lactamases, dont les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ; ce sont des enzymes qui peuvent hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines (CARLE, 2009 ; COURVALIN et LECLERCQ, 2012 ; ELHANI, 2012 ; BECEIRO *et al.*, 2013 ; DOI *et al.*, 2017).

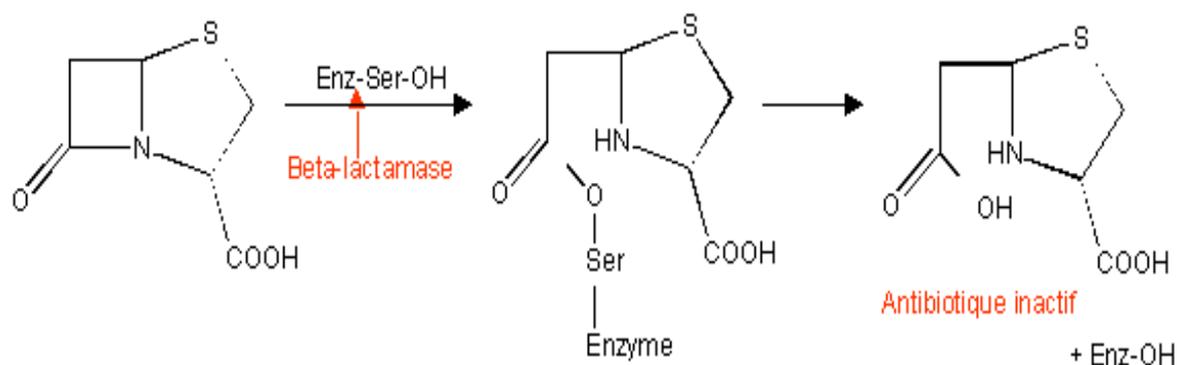


Figure 11 : Inactivation des bêta-lactamines par les β -lactamases (ANONYME 06).

3.4.1.2. Imperméabilité de la membrane externe

La membrane externe des bactéries est traversée par des protéines transmembranaires, qui forment des canaux hydrophiles appelées porines. Les bêta-lactamines hydrophiles peuvent également traverser la membrane externe par diffusion passive, en empruntant cette voie. Cependant, des résistances par diminution de la perméabilité ont été rapportées chez *E.coli* suite à une altération quantitative ou qualitative des porines. Ce mécanisme est souvent associé à d'autres mécanismes de résistance : efflux actif et / ou production de β -lactamases (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

3.4.1.3. Efflux actif

Le système efflux est constitué chez les entérobactéries de trois protéines :

- Une, insérée dans la membrane cytoplasmique jouant le rôle de pompe ;
- Une seconde est périplasmique, elle formerait un lien entre la pompe et la porine ;
- Une troisième, qui est une porine insérée dans la membrane externe, assurant le passage au travers de cette membrane.

Ce système agit en expulsant activement des produits toxiques, comme les antibiotiques vers le milieu extérieur (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

3.4.1.4. Modification de PLP

Plusieurs facteurs peuvent concourir à cette résistance (CARLE, 2009 ; COURVALIN et LECLERCQ, 2012) :

- Une perte d'affinité des β -lactamines pour les PLP soit par mutation ou par acquisition de gènes codant pour des PLP d'affinité diminuée ;
- Une hyperproduction de PLP normales.

3.4.2. Les mécanismes de résistance aux aminosides

La diminution de l'affinité des aminosides vis-à-vis leurs cibles est le principal mécanisme de résistance des bactéries aux aminosides. Cette diminution d'affinité a lieu :

- Soit par altération de la cible qui survient par mutation de l'ARN 16S ;
- Soit par modification des aminosides par des enzymes bactériennes affectant ainsi leur fixation sur l'ARN 16S causant la perte de son activité.

Il existe cependant d'autres mécanismes de résistance aux aminosides qui sont : l'imperméabilité membranaire et le système d'efflux actif (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

3.4.3. Mécanismes de résistance aux quinolones

La résistance aux quinolones est due soit à des mutations chromosomiques (COURVALIN et LECLERCQ, 2012) :

- La diminution d'affinité des quinolones vis-à-vis des cibles intracellulaires que sont les enzymes ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV, par modification de ces dernières ;
- La diminution de l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique, par défaut de pénétration passive et / ou excrétion active.

Soit à un transfert de gènes (COURVALIN et LECLERCQ, 2012) :

- Des protéines Qnr plasmidique qui agirait en protégeant l'ADN gyrase de la fixation de quinolones.

3.4.4. Mécanismes de résistance aux tétracyclines

Le principale mécanisme de résistances vis-à-vis ces antibiotiques est le système d'efflux. Les gènes *tet* codent pour des protéines membranaires qui permettent l'efflux de l'antibiotique hors de la cellule, empêchent son accumulation intracellulaire et sa fixation au ribosome. Un autre mécanisme de résistance est la protection du ribosome, via l'expression de protéines cytoplasmiques qui se fixent sur le ribosome, empêchant ainsi la fixation de l'antibiotique et entraînant son relargage vers le milieu extérieur et rendent au ribosome sa conformation originelle (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

3.4.5. Mécanismes de résistance aux polymyxines

Le mécanisme de résistance aux polymyxines est la modification du lipide A, ou dans des cas rares la perte totale du lipopolysaccharide, ce qui entraîne une diminution de l'efficacité de la polymyxine. Un autre mécanisme de résistance utilisé par les bactéries vis-à-vis de ces molécules est la diminution de la perméabilité (COURVALIN et LECLERCQ, 2012 ; YUN LIU *et al.*, 2016).

3.4.6. Mécanismes de résistance à l'association sulfamides et triméthoprime

De toutes les familles d'antibiotiques, l'association sulfamide-triméthoprime possède indiscutablement la plus grande diversité des mécanismes de résistance acquise (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

3.4.6.1. Les sulfamides

Des mutations au niveau du dihydrofolate synthétase (DHPS) existent chez les bactéries Gram négatif. Elles aboutissent à la formation de DHPS mutants ayant une affinité moindre pour les sulfamides. Le support génétique de ces mutations étant plasmidique, les bactéries ayant acquis cette résistance se retrouvent ainsi avec deux DHPS : la DHPS chromosomique sensible et une DHPS plasmidique résistante qui permettra d'effectuer la synthèse de la tétrahydrofolate, donc la synthèse de thymine (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Un autre mécanisme de résistance utilisé par les bactéries vis-à-vis de ces molécules est la sur-production de la cible (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

3.4.6.2. Les triméthoprimes

Les mécanismes de résistance vis-à-vis la triméthoprine sont nombreux et variés ; il existe des résistances chromosomiques naturelles et d'autres acquises via le transfert de gènes (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Parmi les résistances chromosomiques naturelles : la modification qualitative ou quantitative du dihydrofolate réductase (DHFR). La première consiste en la substitution de certains acides aminés de la DHFR, responsables d'une moindre affinité pour le triméthoprine. La seconde par la production accrue de la DHFR. La résistance au triméthoprine peut aussi être due à une surexpression de pompes d'efflux actives /ou diminution de la perméabilité membranaire (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

La résistance au triméthoprine peut aussi être acquise par transfert de gènes plasmidiques, les bactéries se retrouvent donc avec deux DHFR : l'enzyme chromosomique sensible et une enzyme plasmidique résistante au triméthoprine (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

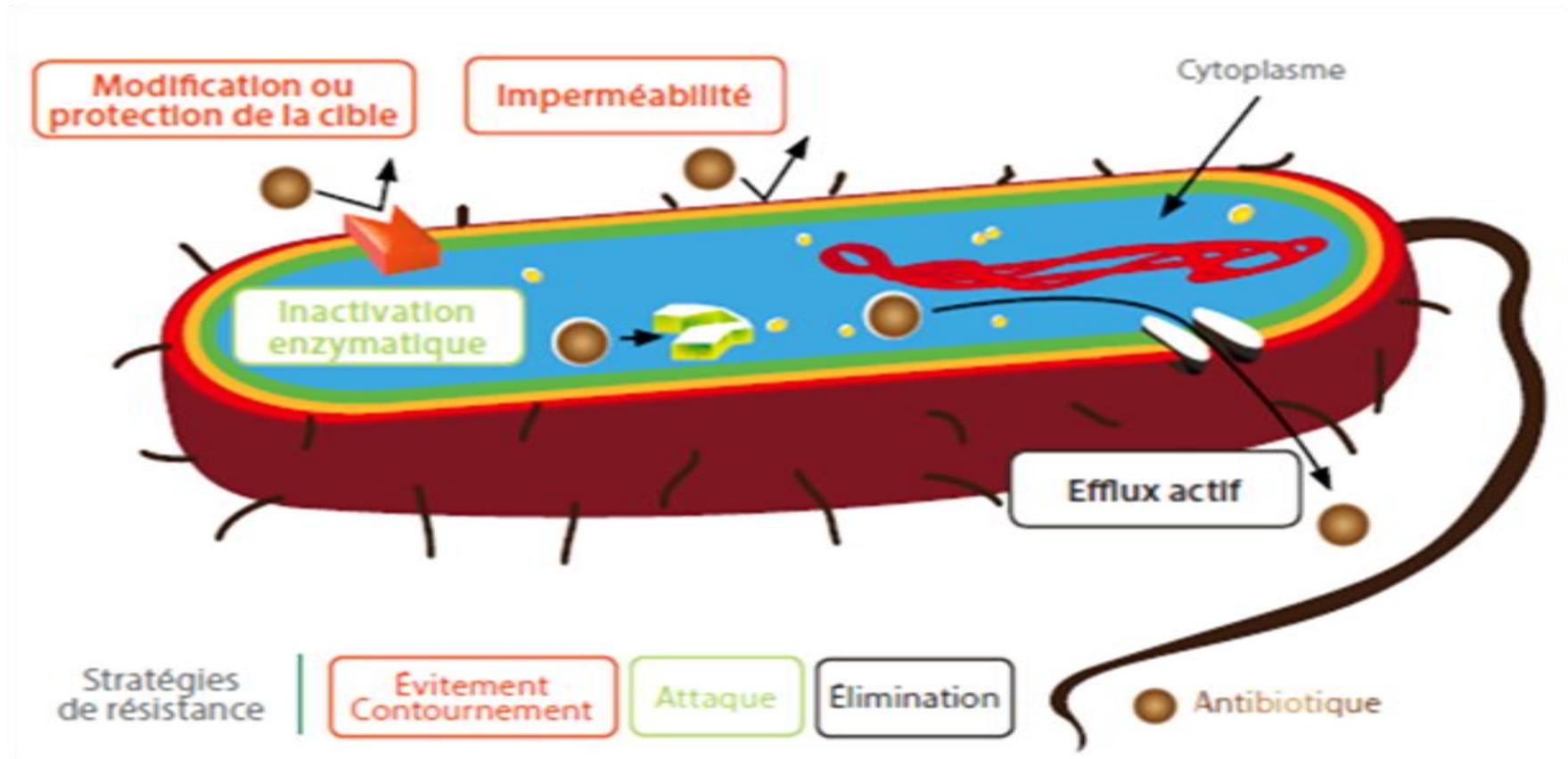


Figure 12 : Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques(CHARDOU et BRUGERE, 2014).

La virulence et facteurs de virulence

4. La virulence et facteurs de virulence

La capacité d'*E.coli* à provoquer des infections extra-intestinales dépend largement de plusieurs facteurs de virulence nécessaires pour sa survie dans des conditions défavorables. L'identification des facteurs de virulence est importante pour la compréhension de la pathogénèse bactérienne et de leurs interactions avec l'hôte (AL-SAIEDI et Al-MAYAH, 2014).

4.1. Définitions

4.1.1. La virulence

La virulence est définie comme étant l'intensité de la maladie causée par un organisme. Il est de plus en plus évident que la virulence est très complexe et dépend de l'interaction entre l'hôte et le micro-organisme (LOVE et JONES, 2008).

4.1.2. Les facteurs de virulence

Selon LOVE et JONES (2008), deux définitions ont été attribuées aux facteurs de virulence :

- Un facteur de virulence est un composant d'un agent pathogène qui, lorsqu'il est supprimé, altère spécifiquement la virulence mais pas la viabilité ;
- Si l'expression d'un produit génique microbien, permet à un agent pathogène de causer un dommage à la cellule hôte alors ce produit est un facteur de virulence.

4.2. Les facteurs de virulence

4.2.1. La résistance au sérum

La résistance à l'activité bactéricide du complément ou la résistance au sérum est nécessaire à la survie des bactéries dans le sang ; elle est considérée comme étant un facteur important dans la virulence des APEC (DZIVA et STEVENS, 2008 ; ROBINEAU et MOALIC, 2010). Les bactéries exposées au sérum de leurs hôtes sont soumises à l'effet antibactérien du système du complément. Toutefois, ces dernières ont développés des mécanismes pour échapper à cette attaque immunitaire (GARZA *et al.*, 2017).

4.2.1.1. Le système complément

Le sérum renferme une trentaine de protéines du système complément. Ce dernier est un élément crucial de la réponse immunitaire innée de l'hôte ; cependant, il peut aussi déclencher une réponse adaptative (MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

Suite à une infection, la cascade du complément peut être activée à travers trois voies distinctes : classique, lectine et la voie alternative (ABREU et BARBOSA, 2017). MIAJLOVIC et SMITH (2014) ont détaillé les trois voies du complément et leurs modes d'activations respectifs :

- L'activation de la première voie est déclenchée par la formation d'un complexe immunitaire : Ag-IgG ;
- La deuxième, par des résidus de sucre retrouvés sur la surface des cellules bactériennes ;
- Par contre, la troisième voie ne nécessite pas la reconnaissance d'une molécule spécifique au pathogène pour être activée ; elle est activée par l'hydrolyse spontanée de C3 dans le plasma.

Après la formation de la C3 convertase, les trois voies convergent vers une voie terminale commune menant à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC). Ce dernier forme des pores transmembranaires sur la membrane des bactéries cibles, causant ainsi leurs morts par lyse cellulaire (MIAJLOVIC et SMITH, 2014 ; ABREU et BARBOSA, 2017).

4.2.1.2. Mécanismes de résistance au sérum (voir figure 13)

L'étude de la résistance au sérum des APEC a permis d'identifier plusieurs mécanismes contribuant à ce phénotype, à savoir la production d'une capsule et l'expression de facteurs. Ces derniers agissent à différents niveaux : blocage de l'accès du complexe MAC à la surface bactérienne, défaut d'activation ou de liaison de certains intermédiaires, dégradation des intermédiaires (MAINIL, 2003 ; MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

4.2.1.2.1. La capsule

La production d'une couche de polysaccharide, de protéines et de glycoprotéines associée à la surface des cellules, connue sous le nom de capsule, est commune chez *E. coli* qui cause la bactériémie. L'expression de la capsule fournit une barrière stérique qui empêche le dépôt des facteurs du complément et inhibe l'efficacité de la l'opsono-phagocytose protégeant ainsi, les membranes extérieures des défenses de l'hôte (LOVE et JONES, 2008 ; MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

La production de capsules K1, K2 et K3 prédomine chez les souches d'*E.coli* pathogènes extra-intestinales (MIAJLOVIC et SMITH, 2014 ; ABREU et BARBOSA, 2017). Le polysaccharide capsulaire K1 est composé d'acide sialique. Le Facteur H, qui est le principal régulateur soluble de la voie alternative, lie les poly-anions tels que l'acide sialique ; en conséquence, une régulation négative de la voie alternative a lieu. Ainsi, les bactéries encapsulées sont protégées contre l'attaque du complément (ABREU et BARBOSA, 2017).

Plusieurs sérotypes de l'antigène O sont aussi associés à la résistance au sérum. L'antigène O agit en activant le complément loin des sites cibles de la membrane externe ou en bloquant les sites de liaison (MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

De récentes études ont montré que l'acide colanique, qui est un exopolysaccharide, contribue également à la survie ExPEC dans le sérum (MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

4.2.1.2.2. Les protéines de la membrane externe

Les souches résistantes à l'effet bactéricide du sérum produisent des protéines localisées au niveau de la membrane externe. Ces protéines sont codées par des gènes plasmidiques : *iss* (*Increased Survival in Serum*) et *traT*, portés sur des plasmides ColV ; ou chromosomiques : OmpA (Outer membrane protein A) ou autres codant pour des protéines de structure de la membrane externe (MAINIL, 2003).

4.2.1.2.2.1. Les protéines codées par des gènes plasmidiques

le gène *Iss* est associé aux APEC ; ce gène est plus fréquemment trouvé chez les souches pathogènes que non pathogènes (NAKAZATO *et al.*, 2009). MIAJLOVIC et SMITH (2014) évoquent une augmentation de la survie des souches exprimant le gène *iss* dans le sérum, même si ce mécanisme reste indéterminé, il a été suggéré que l'*Iss* interfère dans l'action du MAC.

L'expression de *TraT* conduit à la formation d'une lipoprotéine de la membrane externe. Celle-ci peut empêcher le dépôt du C3 sur la surface bactérienne et affecter la perméabilité de la membrane externe (MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

Ainsi, l'inactivation de l'effet bactéricide du sérum peut être causée par un ensemble de protéines codées par des plasmides, ce qui explique l'émergence de bactéries qui présentent cette résistance (LOVE et JONES, 2008 ; MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

4.2.1.2.2. Les protéines codées par des gènes chromosomiques

Afin de protéger les cellules du soi, des effets lytiques et inflammatoires résultant de l'activation du complément, une régulation négative de ce dernier est assurée par des protéines régulatrices de l'hôte. L'une des stratégies adoptées par les souches d'*E.coli*, résistantes au sérum, est la fixation de ces régulateurs du complément (ABREU et BARBOSA, 2017). Ces souches possèdent au niveau de leurs membranes externes des protéines (OmpA, OmpW), ayant la faculté de fixer ces régulateurs.

4.2.1.2.2.1. La protéine A de la membrane externe (OmpA)

La protéine A de la membrane externe (OmpA) est une protéine impliquée dans la résistance au sérum. Elle est abondante et hautement conservée dans les souches d'*E.coli* ; la survie de ces dernières dans le sérum est favorisée par l'expression de cette protéine.

Il a été montré que l'OmpA d'*E.coli* K1 se lie au composé 4 du complément (C4BP), qui est une protéine régulatrice du complément. C4BP liée à OmpA reste fonctionnelle, agissant comme cofacteur du facteur I, une sérine protéase qui dégrade C4b et C3b inhibant ainsi la formation de C3 convertase de la voie classique du complément. L'interaction de l'OmpA avec C4BP pourrait potentiellement permettre une régulation négative du complément sur la surface bactérienne, contribuant de ce fait à leur survie et dissémination (MIAJLOVIC et SMITH, 2014 ; ABREU et BARBOSA, 2017).

Une autre protéine appelée new lipoprotéine Nlpl, interagit avec OmpA ; cette interaction peut être nécessaire pour la fonctionnalité OmpA (MIAJLOVIC et SMITH, 2014 ; ABREU et BARBOSA, 2017).

4.2.1.2.2.2. La protéine W de la membrane externe (OmpW)

Plus récemment, une protéine de la membrane externe OmpW, qui est présente chez un grand nombre de bactéries Gram négatif, s'est révélée lier FH, le principal régulateur soluble de la voie alternative de complément.

Des tests sur l'activité bactéricide du sérum ont été effectués, montrant que l'OmpW confère un certain degré de protection contre la mort médiée par la voie alternative du complément ; cependant, des essais supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si FH lié à OmpW reste fonctionnel (ABREU et BARBOSA, 2017).

4.2.1.2.2.3. La protéine C de la membrane externe (Omp C)

L'OmpC est un agent immunogène majeur, se trouvant à la surface d'*E. coli* agissant comme cible pour l'anti-OmpC : IgG. Elle favorise le dépôt de C1q, produit du clivage du C1, et l'induction de la voie anticorps dépendante : la voie classique du complément (MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

La perte d'OmpC augmente la résistance au sérum, cela est dû au fait que cette dernière n'est plus exposée à la surface des cellules bactériennes réduisant ainsi, l'activation de la voie classique du complément (MIAJLOVIC et SMITH, 2014)

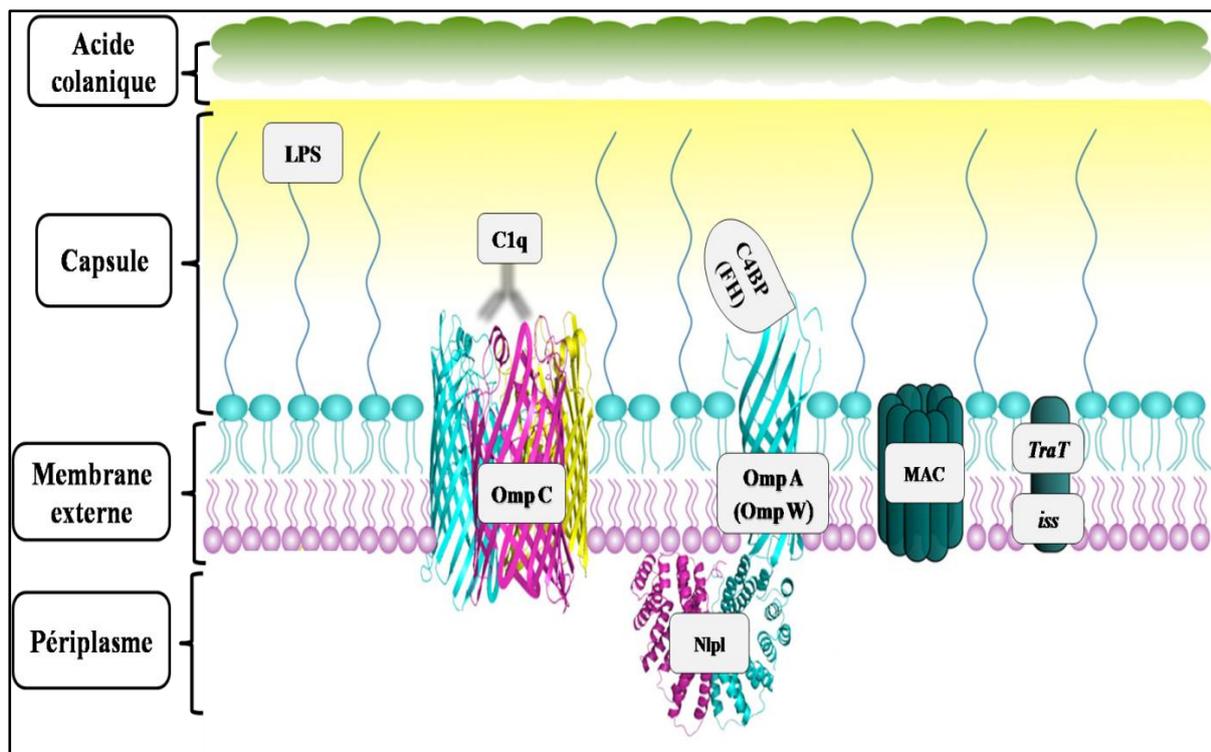


Figure 13 : Différents mécanismes de résistance au sérum utilisés par les APEC (MIAJLOVIC et SMITH, 2014).

4.2.2. La fixation du rouge Congo

Selon LA RAGIONE et WOODWARD (2002) ; NAKAZATO *et al.* (2009), la capacité de lier le colorant acide diazole hydrophobe, le rouge Congo, a été observée chez les APEC. Le rouge Congo a une affinité pour le polysaccharide de la capsule bactérienne (LA RAGIONE et WOODWARD, 2002).

Certains auteurs ont proposé l'utilisation de cette caractéristique comme marqueur de virulence sur ces micro-organismes, en utilisant ce colorant bactériologique, comme

composant important dans le milieu pour déterminer la production de polysaccharide (NAKAZATO *et al.*, 2009 ; HAWKINS *et al.*, 2017) ; ceci permet de différencier les micro-organismes pathogènes et les non pathogènes (AL-SAIEDI et AL-MAYAH, 2014). Les isolats d'*E.coli* liant ce colorant sont considérés comme étant invasifs (LA RAGIONE et WOODWARD, 2002).

4.2.3. La production de l'hémolysine

L'hémolysine est une toxine cytolytique ; il s'agit d'une protéine sécrétée par certains isolats d'*E.coli*(VAISH *et al.*, 2016). Sa production est généralement associée à la pathogénicité des *E.coli* responsables des infections les plus sévères (AL-SAIEDI et AL-MAYAH, 2014). Selon LA RAGIONE et WOODWARD (2002), une minorité d'APEC sont hémolytiques. Des auteurs tels que NAKAZOTO *et al.* (2009) ont rapporté la production de toxines cytolytiques par les APEC ; cependant, les mécanismes d'actions des hémolysines produite par ces dernières sont très peu rapportés dans la littérature.

4.3. Relation entre la résistance aux antibiotiques et la virulence

La résistance aux antibiotiques est souvent associée à une infection et est donc également liée à la virulence. Bien que la résistance aux antibiotiques n'est pas en soi un facteur de virulence, dans certaines situations, c'est un facteur clé dans le développement de l'infection (BECEIRO *et al.*, 2013). Du point de vue biologique, l'acquisition de résistance ou de traits de virulence peut représenter un avantage pour la survie des micro-organismes. Les mécanismes de virulence sont nécessaires pour surmonter les systèmes de défense de l'hôte et le développement de la résistance aux antimicrobiens est essentiel pour permettre aux bactéries pathogènes de surmonter les traitements antimicrobiens (DA SILVA et MENDONÇA, 2012 ; BECEIRO *et al.*, 2013).

Une hypothèse expliquant ce phénomène a été établie par DA SILVA et MENDONÇA (2012), selon laquelle les déterminants génétiques de la virulence sont situés sur le support génomique de la résistance aux antimicrobiens, tels que les plasmides, les transposons ou les intégrons et peuvent donc être co-mobilisés sous la pression sélective antimicrobienne, jouant ainsi un rôle crucial dans la propagation de la résistance aux antibiotiques mais aussi dans la propagation de la virulence. Ceci a déjà été observé chez les APEC où la résistance à plusieurs antibiotiques a été reliée à la présence de plasmides, qui sont également responsables de la transmission horizontale des facteurs de virulence.

Cette association n'est cependant pas systématique vu qu'une résistance accrue est associée dans la plupart des cas, directement ou indirectement, avec la diminution de la virulence (BECEIRO *et al.*, 2013). En 2012, DENAMUR et PICARD ont établi une corrélation entre la présence de gène chez les ExPEC, codant pour la résistance aux quinolones avec la perte partielle ou totale de traits de virulence.

4.4. Relation entre les APEC et les extra-intestinal infectant les humains

Pour adhérer, coloniser, envahir et enfin provoquer une infection, les souches APEC utilisent un ensemble de traits de virulence (CUNHA *et al.*, 2014). Tout comme chez les ExPEC humains, les APEC peuvent exprimer un répertoire diversifié et hétérogène de gènes de virulence, grâce à leur potentiel zoonotique. D'après STROMBRRG *et al.* (2017), Les APEC pourraient être transmis aux humains par la consommation de viande contaminée.

CUNHA *et al.* (2014) ont souligné que la volaille serait un réservoir pour les ExPEC humains (voir figure 13) représentant ainsi, un risque pour la santé publique. Ils ont montré que certains clones des APEC sont très semblables aux pathotypes extra-intestinaux qui affectent les humains (UPEC : *E.coli* uropathogène, NMEC : *E.coli* causant une méningite néonatale). L'exemple le plus connu est l'antigène capsulaire K1, des *E.coli* associés à des méningites chez l'homme et à des infections systémiques chez la volaille (MAINIL, 2003).

Étude expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Objectif

L'étude du comportement de 50 souches d'*E.coli* d'origine aviaire potentiellement pathogènes vis-à-vis de 24 antibiotiques a été réalisée, suivi des essais de conjugaison bactérienne, afin de déterminer le support génétique de la multirésistance. Par ailleurs, dans un second volet, trois facteurs de virulences ont été mis en évidence phénotypiquement chez les souches étudiées, à savoir : la résistance au sérum, la fixation du rouge Congo et l'hémolysine. L'objectif de cette étude, étant d'établir une corrélation entre les profils d'antibio-résistance et la présence potentielle de facteurs de virulence.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Souches testées

Cinquante souches d'*E.coli* d'origine aviaire ont fait l'objet de cette étude. Elles ont été fournies par le laboratoire régional vétérinaire de Draa Ben kheda. Ces dernières étaient issues de lésions de colibacillose (isolées à partir d'organes) et de matières fécales issues de poules infectées, provenant de différentes régions du centre Algérien, dont : Tiziouzou, Béjaia, Bouira, Boumerdès, Bourdj Bou Arreridj, Alger et Msila.

1.1.2. Souches de références

Les souches de références utilisées sont les suivantes : *E.coli* ATCC 25922 pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme et *E.coli* K12 (AZ^R) comme souche réceptrice pour la conjugaison bactérienne.

1.2. Matériel du laboratoire

Le matériel utilisé est celui du laboratoire de biochimie analytique et de biotechnologie où nous avons effectué un stage de 22 semaines (l'annexe 01 renferme la liste du matériel du laboratoire utilisé).

2. Méthodes

2.1. Isolement

L'isolement des souches d'*E.coli* a été effectué sur milieu sélectif DCLS (Désoxycholate-citrate-lactose-saccharose) en utilisant la méthode de dilution par stries. Un second isolement sur ce même milieu a permis de s'assurer de la pureté des souches isolées.

2.2. Identification

Afin de, déterminer si les souches bactériennes sont bien des *E.coli*, une identification en deux étapes a été effectuée :

- Une étude macroscopique des colonies et une observation microscopique de frottis colorés (coloration de Gram), pour mettre en évidence les caractéristiques propres à *E.coli* ;
- Un ensemble de tests biochimiques pour étudier leurs métabolismes. La technique ainsi que les détails des tests sont résumés dans le tableau I.

Tableau I: Identification : Principaux tests biochimiques de l'identification d'*E.coli*.

Tests biochimiques	Le milieu	Ensemencement	Réactifs	Lecture
Test Urée-Indole et la TDA	Milieu Ferguson	Ensemencer le milieu avec les souches à tester puis les incuber à 37°C pendant 24h. Remarque :	Test de l'Urée	Urée + : rouge violacée Urée - : reste orange
			Test de la TDA : perchlorure de fer	TDA+ : précipité brun chamois TDA- : Absence de précipité
			Test de l'Indole : Réactif de Kovacs	Indole + : Formation d'un anneau rouge Indole - : Absence de coloration rouge
Test Citratase	Milieu citrate de Simmons	Le milieu citrate de Simmons est ensemencé en stries (milieu en pente).	Test de Citratase	Citratase + : coloration bleu Citratase - : Absence de coloration
Test Nitrate réductase	Bouillon nitraté		RN1 : acide sulfanilique	Nitrate réductase+ : coloration rouge

			RN2 : Naphtylamine	Nitrate réductase- : Absence de coloration
--	--	--	-----------------------	--

2.3. Antibiogramme

Les antibiogrammes ont été réalisés suivant les recommandations du Comité des antibiogrammes de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM,2017).

2.3.1. Principe

L'antibiogramme est un examen permettant d'évaluer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Lors de cette étude, la méthode de diffusion en milieu gélosé a été appliquée suivant la norme NF U47-107. Elle est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique obtenu par diffusion des disques d'antibiotiques déposés sur milieu gélosé.

2.3.2. Milieu utilisé

La gélose Mueller Hinton est coulée dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.

2.3.3. Technique

2.3.3.1. Préparation de l'inoculum

- Les souches testées sont revivifiées sur bouillon HIB, puis incubées à 37°C pendant 18h ;
 - Après incubation, les souches revivifiées sont ensemencées par la méthode des cadrans sur gélose Mueller-Hinton. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h ;
 - A partir de la culture pure ensemencée sur MH, deux colonies sont prélevées puis suspendues dans 10ml d'eau physiologique stérile. La suspension est ensuite bien homogénéisée à l'aide d'un vortex ;
 - La densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à une longueur d'onde de 625 nm à une valeur de 0,08 à 0,1 équivalente à une charge de 10^8 cellules/ml ;
- Une dilution au 1/100 est ensuite réalisée afin d'ajuster la charge de la suspension bactérienne à 10^6 cellules/ml.

2.3.3.2. Ensemencement

- L'ensemencement se fait sur milieu MH, par inondation de la surface entière de la gélose en versant 3 à 5ml de la suspension bactérienne standardisée ;
- Après quelques minutes, l'excès est rejeté et les boîtes sont laissées sécher 15 min, à température ambiante.

2.3.3.3. Application des disques d'antibiotiques et incubation

- A l'aide d'une pince stérile, les disques d'antibiotiques sont placés à la surface de la gélose à une distance de 3cm les uns des autres ;
- Une phase de pré-diffusion des antibiotiques à température ambiante est nécessaire avant l'incubation à 37°C pendant 24 heures.

2.3.4. Lecture

- Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés à l'aide d'une règle puis comparés aux diamètres critiques figurant dans les recommandations du CA-SFM (2012, 2016 et 2017) ;
- Les souches bactériennes sont ensuite classées en fonction de leurs zones d'inhibitions en 3 catégories : Sensibles (S), Résistantes (R), Intermédiaires (I) (l'interprétation est faite selon les critères du CA-SFM).

2.4. Le contrôle de qualité

Le contrôle de qualité a été effectué dans les mêmes conditions que les antibiogrammes, à l'aide de la souche de référence *E.coli* ATCC25922 et ce, afin de s'assurer de la précision des résultats obtenus.

La liste des antibiotiques testés et leurs charges sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau II : Les disques d'antibiotiques et leurs charges.

Famille et sous- Famille des antibiotiques	Nom d'antibiotique	Abréviation	Charge (µg)
--	--------------------	-------------	-------------

Bêta-lactamines	Amino-pénicilline et association	Ampicilline	AMP	10
		Amoxicilline	AMX	30
		Augmentin : Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	30
	Carboxy- pénicilline	Ticarcilline	TIC	75
	Céphalosporine de 1 ^{ère} génération.	Céfazoline	CZ	30
		Céfalotine	KF	30
	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération.	Céfotaxime	CTX	30
		Céftazidime	CAZ	30
	Céphalosporine de 4 ^{ème} génération.	Cefepime	FEP	30
	Carbapénèmes	Ertapénème	ETP	10
		Imipénème	IPM	10
	Monobactame	Aztreonam	ATM	30
Aminosides	Amikacine	AK	30	
	Kanamycine	K	30	
	Gentamicine	GEN	10	
	Tobramycine	TOB	10	
Tétracycline	Tétracycline	TE	30	
Polymyxine	Colistine	Cs	10	
Quinolones et fluoroquinolones	Péfloxacine	PEF	5	
	Ofloxacine	OFX	5	
	Acide nalidixique	NA	30	
	Acide pipémidique	PA	20	
	Ciprofloxacine	CIP	5	
Association de Triméthoprime et sulfaméthoxazole	Co-trimoxazole	SXT	25	

2.5. Recherche des β -lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE)

2.5.1. Principe et technique

Ce test a été effectué suivant les recommandations du CA-SFM sur milieu Mueller-Hinton, en utilisant la méthode DDS (Double Disque Synergie) qui consiste à rechercher une synergie entre un disque contenant un inhibiteur de bêta-lactamase (Amoxicilline-acide clavulanique) et un disque de céphalosporine de troisième génération (Céfotaxime) ou l'Aztreoname. Ces disques doivent être placés à une distance de 25 à 30 mm sur un même axe.

2.5.2. Lecture

L'observation d'un aspect en bouchon de champagne sur l'antibiogramme, permettra de déceler la présence d'une BLSE chez les souches bactériennes étudiées.

2.6. Conservation de souches

Les souches isolées, purifiées et identifiées ont été conservées en piqure centrale sur gélose de conservation, à partir des cultures pures sur milieu MH.

2.7. La conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne a été effectuée, afin de déterminer le support génétique (plasmidique ou chromosomique) de la résistance aux antibiotiques. A partir de souches donatrices multirésistantes (aux β -lactamines, quinolones et tétracycline), des essais de transfert du caractère de résistance à l'amoxicilline et l'acide Nalidixique ont été réalisés. Le protocole adopté est inspiré des travaux de BAKOUR *et al.*, 1983 ; COURVALIN *et al.*, 1985. La souche réceptrice utilisée est *E. coli* K12 (AZ^R) et les souches donatrices sont : E10, E16, E31, et E40 (voir le profil d'antibiorésistance en annexe 04).

2.7.1. Technique

- Des solutions mère d'amoxicilline et d'azide de sodium sont préparées selon les concentrations indiquées dans le tableau III ;
- Les souches donatrices et la souche réceptrice sont revivifiées respectivement sur BHIB additionné d'Amoxicilline et BHIB additionné d'azide de sodium et ensuite incubées à 37°C pendant 24h ;
- Afin de confirmer la pureté et le caractère résistant des souches donatrices et de la souche réceptrice, ces dernières sontensemencées sur MH contenant de l'amoxicilline et sur MH contenant de l'azide de sodium respectivement, puis incubées à 37°C pendant 24h ;

En parallèles, les souches donatrices sontensemencées sur MH contenant de l'azide de sodium, la souche réceptrice estensemencée sur milieu MH contenant l'acide

Nalidixique et sur milieu MH contenant l'amoxicilline, pour s'assurer de la sensibilité de ces dernières à ces agents sélectifs ;

- Une fois revivifiées les souches sont mises en contact : 1ml de la souche donatrice et 2ml de la souche réceptrice, sont déposées en spot au centre d'une boîte de milieu MH. Celle-ci est incubée à 37°C pendant 24h;
- Après incubation, un développement de colonies est observé ; ces dernières sont prélevées et mises en suspension dans 200µl d'eau physiologique stérile. La suspension est ensuite vortexée pour bien homogénéiser ;
- La totalité de la suspension estensemencée par étalement sur boîtes de sélection de transconjugants contenant du Mueller-Hinton additionné d'agents sélectifs : amoxicilline ou l'acide Nalidixique et l'azide de sodium (selon des concentrations critiques indiquées dans le tableau III), et enfin incubées à 37°C pendant 24h.

2.7.2. Lecture

L'observation de colonies sur les boîtes de sélection correspond à un développement de transconjugants résistants à l'amoxicilline ou l'acide Nalidixique et à l'azide de sodium, ce qui nous permet de conclure que la résistance à l'amoxicilline ou l'acide Nalidixique est plasmidique. Dans le cas contraire, la résistance est à médiation chromosomique.

N.B. :

- Deux essais de transfert de gènes, codant pour la résistance à l'Amoxicilline et à l'acide Nalidixique, ont été réalisés pour chaque souche ;
- Les concentrations finales des agents sélectifs utilisées lors de la conjugaison, sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau III : Détails des préparations utilisées pour la conjugaison.

Souches	Donatrices	Réceptrice	Transconjugants
---------	------------	------------	-----------------

Concentration finale des agents sélectifs	AMX (16µg/ml)	NA (16µg/ml)	AZ (300 µg/ml)	AZ (300 µg/ml)	AMX (16 µg/ml) + AZ (300 µg/ml)	NA (16 µg/ml) + AZ (300 µg/ml)
--	---------------	--------------	----------------	----------------	---------------------------------	--------------------------------

AMX : Amoxicilline ; AZ : Azide de sodium ; NA : Acide Nalidixique

2.8. Recherche de facteurs de virulence

Afin d'évaluer la virulence des souches testées, les facteurs de virulence suivants, ont été recherchés : la Résistance au sérum, la fixation du rouge Congo et l'hémolysine.

2.8.1. La résistance au sérum

La résistance au sérum humain consiste en la résistance des bactéries au système complément, elle est déterminée par la technique en spot sur milieu solide de FIERER *et al.* (1972).

2.8.1.1. Technique

- Les souches à tester ont été revivifiées sur bouillon HIB et incubées à 37°C pendant 18h ;
- A partir de la culture en phase exponentielle, 20µl ont été prélevés et ensemencés dans l'eau physiologique stérile (dilution 1/500) ;
- 100µl ont été prélevés à partir de cette dilution ; puis ensemencés par étalement sur milieu gélosé Mueller-Hinton, et incubés à 37°C pendant 15min pour une meilleure absorption ;
- 50µl de sérum humain ont ensuite été déposés au centre de la boîte. Celle-ci est incubée à 37°C pendant 24h.

2.8.1.2. Lecture

Un développement au centre de la boîte, témoignera de la résistance des souches au sérum ; tandis que l'absence de développement sera synonyme d'une sensibilité.

2.8.2. La fixation du rouge Congo

2.8.2.1. Milieu utilisé

Le milieu utilisé est le Tryptase-Soja-Agar (TSA) additionné du rouge Congo à raison de 0,02% (le colorant est incorporé à la gélose lors de la préparation). La technique décrite ci-dessous est inspirée des travaux MELLATA, 1998 ; AL-SAIEDI et AL-MAYAH (2014).

2.8.2.2. Technique

Après avoir coulé les boîtes de Pétri, un ensemencement en stries a été effectué à partir d'un milieu d'enrichissement des souches concernées (BHIB). Ces dernières ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24h.

2.8.2.3. Lecture

Le test est considéré positif, lorsqu'il y a développement de colonies rouges, ce qui correspond à l'expression phénotypique de la fixation du colorant. Les colonies blanches sont considérées comme avirulentes.

2.8.3. Test de l'hémolysine

2.8.3.1. Milieu utilisé

La gélose Columbia a été préparée, puis autoclavée et additionnée de sang humain à raison de 5%.

2.8.3.2. Technique

- Les souches étudiées ont été revivifiées sur BHIB et incubées à 37°C pendant 24h ;
- Les souches revivifiées ont été ensemencées en stries sur la gélose Columbia additionnée de sang et incubées à 37°C pendant 24h (AL-SAIEDI et AL-MAYAH, 2014).

2.8.3.3. Lecture

Trois cas de figures peuvent être observés :

- Développement de colonie entourée d'un halo blanc, correspondant à une hémolyse complète des globules rouges : il s'agit de l'hémolysine β ;
- Lorsque l'hémolyse est incomplète, les colonies sont entourées d'un halo verdâtre, ce qui est caractéristique de l'hémolysine α ;
- S'il n'y a pas de développement ; cela signifie que la souche testée est non hémolytique : il s'agit de hémolysine γ .

2.9. Analyse statistique

Afin de déterminer l'existence d'une corrélation entre l'antibiorésistance et la virulence, une analyse statistique a été effectuée

2.9.1. Test de Khi-deux

Le test statistique adéquat est le test d'indépendance de Khi-deux, qui permet d'établir une relation entre deux caractères qualitatifs chez une population de 50 souches : nous avons 24 modalités pour l'antibiorésistance (les 24 antibiotiques) et 3 modalités pour la virulence (résistance au sérum, fixation du rouge Congo et l'hémolysine).

Des hypothèses de départ sont formulées :

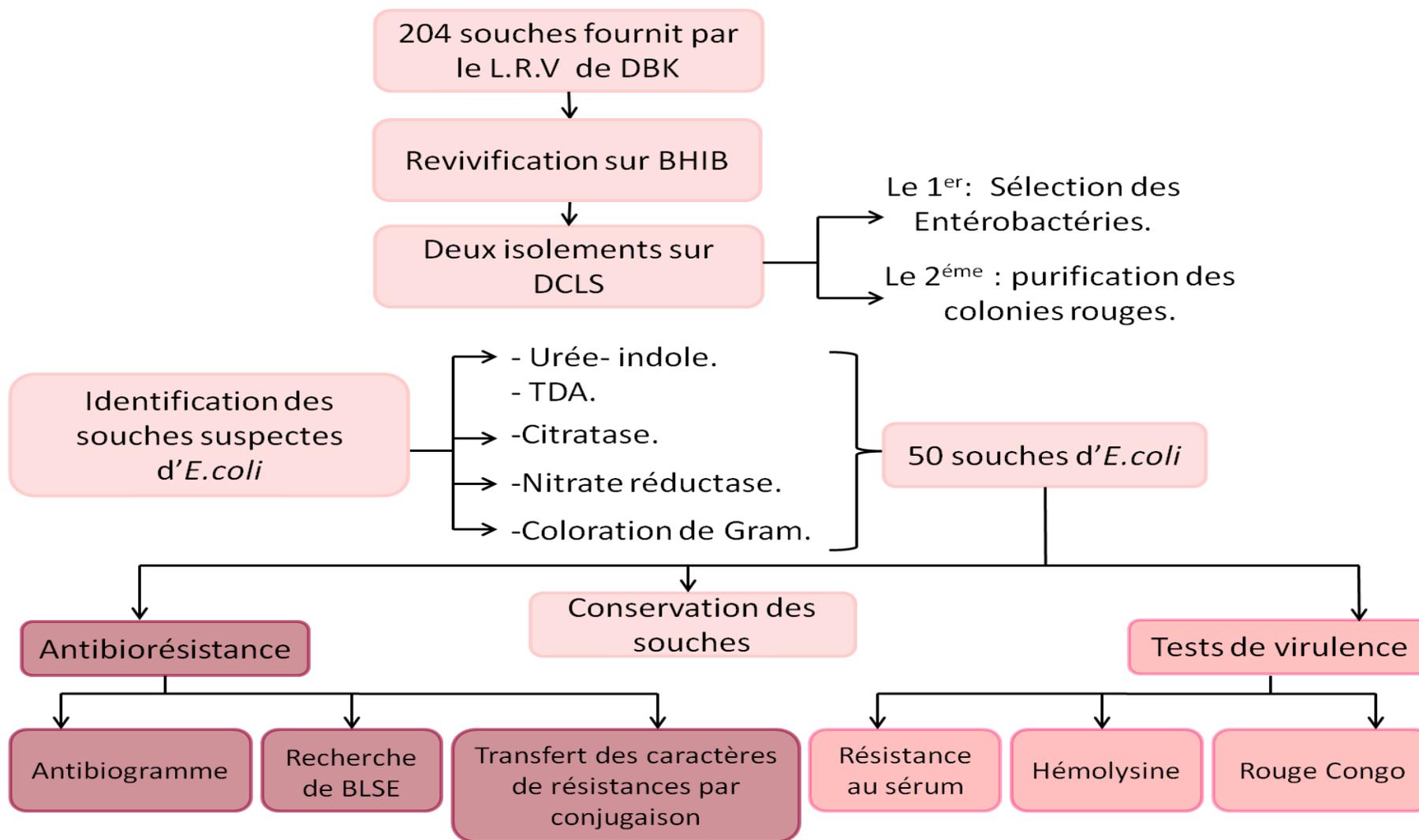
H_0 = il n'y a pas de lien entre l'antibiorésistance et la virulence.

H_1 = il y a un lien entre l'antibiorésistance et la virulence.

2.9.2. Lecture

Selon la valeur du P-value, nous déduisons s'il y a un lien ou non :

- Si p-value $< \alpha$ (risque supposé par l'expérimentateur = 5%) ; donc, l'hypothèse H_0 est rejetée et H_1 est accepté.
- Si p-value $> \alpha$; donc, l'hypothèse H_0 est acceptée.



L.R.V. : laboratoire régional vétérinaire ;DBK :Draa Ben kheda ; BHIB :Brainheart infusionBroth ; DCLS :Désoxycholate- Citrate-Lactose-Saccharose ; *E.coli* :*Escherichia coli* ; TDA :Tryptophane désaminase ; BLSE :Bêta-lactamase à spectre étendu.

Figure 14: Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale.

Résultats et discussion

Résultats

1. Résultats

1.1. Isolement

Les isolements réalisés sur milieu sélectif des entérobactéries, DCLS, révèlent des colonies rouges. Cette coloration est due à la fermentation du lactose présent dans le milieu, qui est l'un des caractères distinctifs de l'identification des *E.coli* (voir figure 15).

1.2. Identification

1.2.1. Etude macroscopique

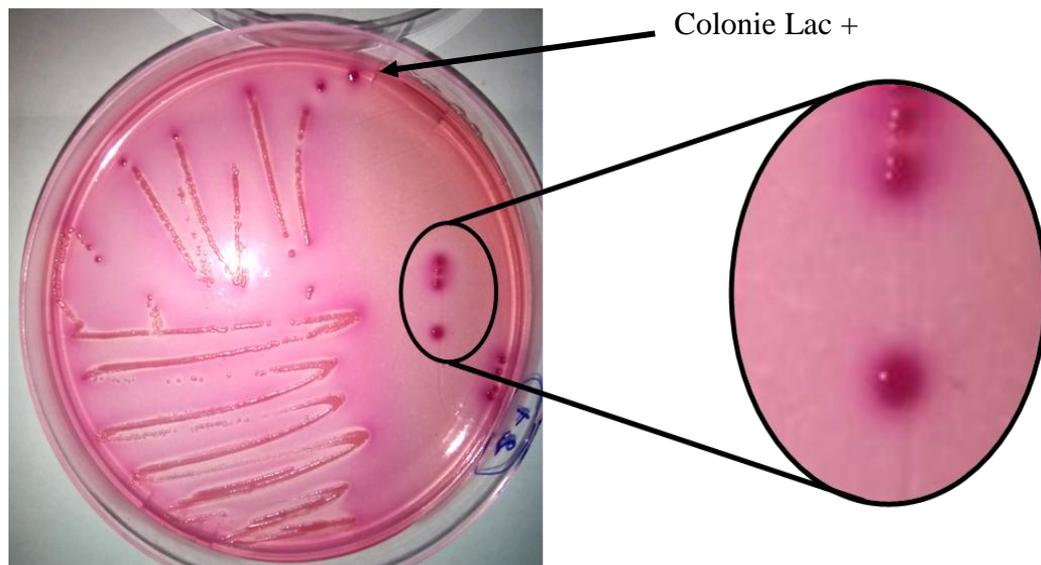


Figure 15 : Photo de colonies Lac + d'*E.coli* sur milieu DCLS.

L'étude macroscopique des colonies repose sur la détermination des 8 critères suivants :

Tableau IV : Caractéristiques des colonies suspectes d'*E.coli*.

L'aspect	3mm
La forme	la colonie à bord régulier
Chromogène	rouge
Opacité	opaque
Élévation	bombé
Surface	brillante et lisse
Consistance	humide et homogène
Odeur	caractéristique

1.2.2. Coloration de Gram

L'observation microscopique des souches, indique que se sont des bactéries Gram négatif : les coccobacilles, isolés, de taille moyenne apparaissent colorés en rose suite à la fixation de la fuschine (figure 16).

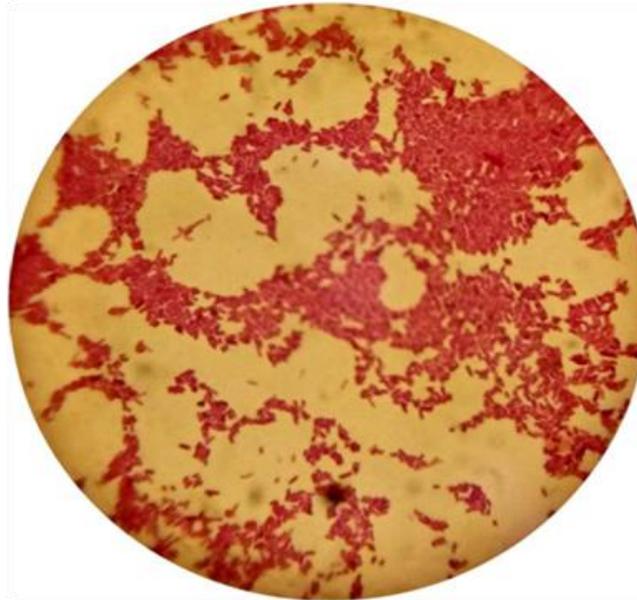


Figure 16: Observation microscopique de frottis après une coloration différentielle (coloration de Gram) de souches d'*E. coli* suspectes (Gx1000).

1.2.3. Résultats des tests biochimiques (voir Annexes 4 : tableaux VI)

1.2.3.1. Tests urée-indole et TDA

E. coli est Uréase(-), TDA(-), et indole (+). L'identification repose sur ces tests, particulièrement la production d'indole qui est un test discriminant pour les *E. coli* (voir figure 17).

1.2.3.2. Test Citratase

E. coli est Citratase (-). L'enzyme Citratase responsable de la dégradation du citrate n'est donc pas produite ; d'où l'incapacité d'*E. coli* à se développer sur le milieu Citrate de Simmons (le citrate est la seule source de carbone de ce milieu) (figure 17).

1.2.3.3. Test nitrate réductase

E. coli est nitrate réductase (+). L'apparition d'une coloration rouge brique est observée, celle-ci est due à la réduction des nitrates présents dans le milieu en nitrites (figure 17).

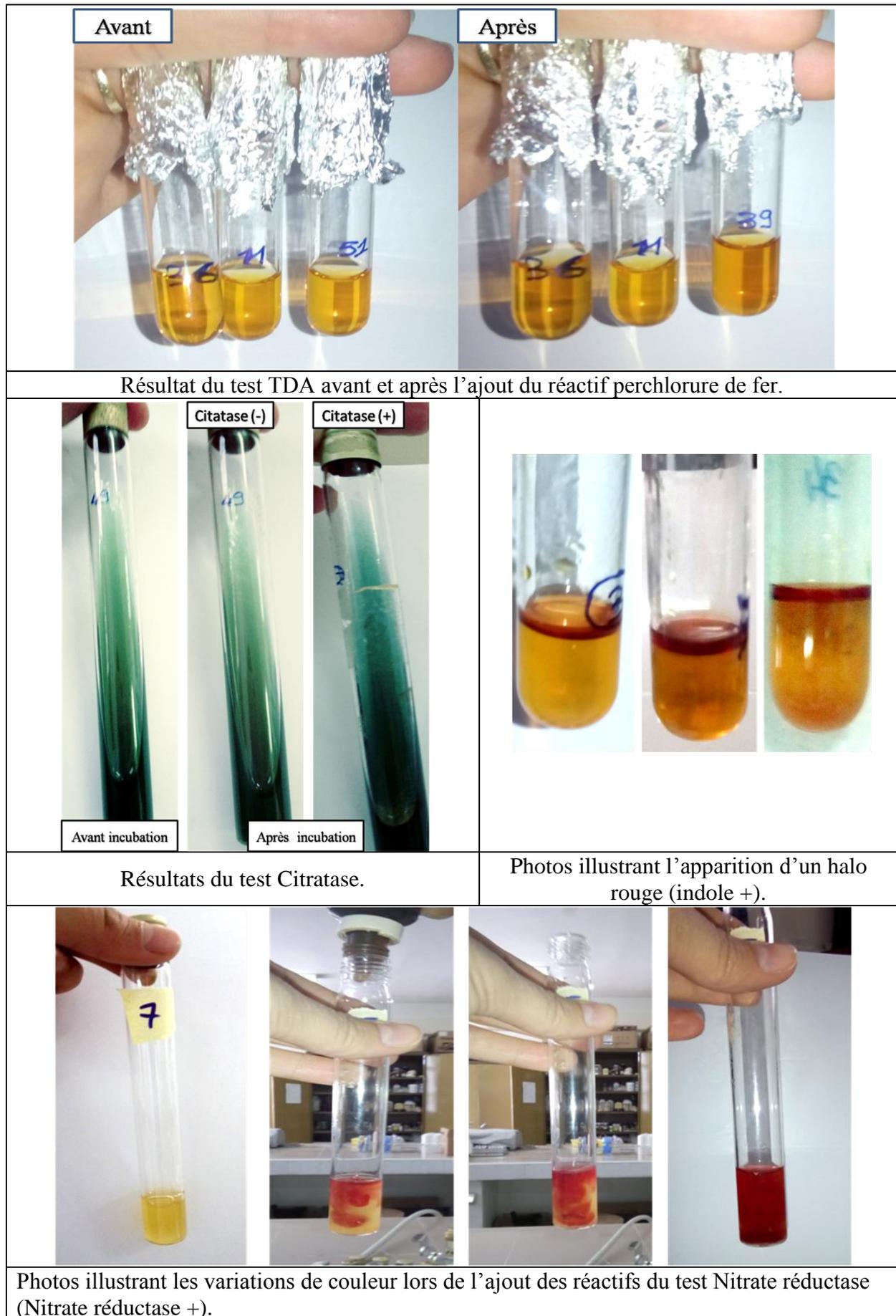


Figure 17: Photos illustrant les résultats des tests biochimiques.

Sur un total de 204 souches aviaires testées, seul 50 souches isolées ont concordé aux caractères de l'identification de l'espèce *E.coli*.

1.3. Résultats des antibiogrammes

L'étude de la sensibilité de 50 souches d'*E.coli* d'origine aviaire isolées majoritairement de lésions de colibacillose, vis-à-vis de 24 antibiotiques, appartenant à différentes familles chimiques, a révélé la résistance de l'ensemble de souches testées.

Les molécules les plus actives sont la tobramycine et l'amikacine avec aucune souche résistante à ces molécules. De faibles taux de résistance ont été notés à l'encontre de l'imipénème, l'ertapénème, le céfotaxime, céftazidime avec 2%, la cefepime (4%), de la gentamicine et l'aztreonam (6%) et enfin 8% pour la colistine et la céfazoline.

Des taux moyens sont à signaler pour la céfalotine (22%), la kanamycine (38%), les associations : triméthoprim-sulfaméthoxazole (46%) et l'amoxicilline-acide clavulanique (47%).

Les taux de résistances les plus élevés ont été observés vis à vis de la tétracycline (86%), l'acide Nalidixique (76%) et 66% respectivement pour l'ofloxacine et la ticarcilline.

Il faut signaler que dans la famille des quinolones, des niveaux de résistance importants ont été constatés : le plus haut niveau a été enregistré pour l'acide Nalidixique avec 76%, alors que le plus bas niveau de résistance a été noté pour la ciprofloxacine (54%). Les taux de résistances les plus élevés de la famille des bêta-lactamines et des aminosides sont respectivement ceux de la ticarcilline (66%) et de la kanamycine (38%).

L'ensemble des taux de résistance et de sensibilité aux antibiotiques est regroupé dans la figure 18. Les profils de sensibilité et résistance des souches testées sont résumés dans l'annexe n°4.

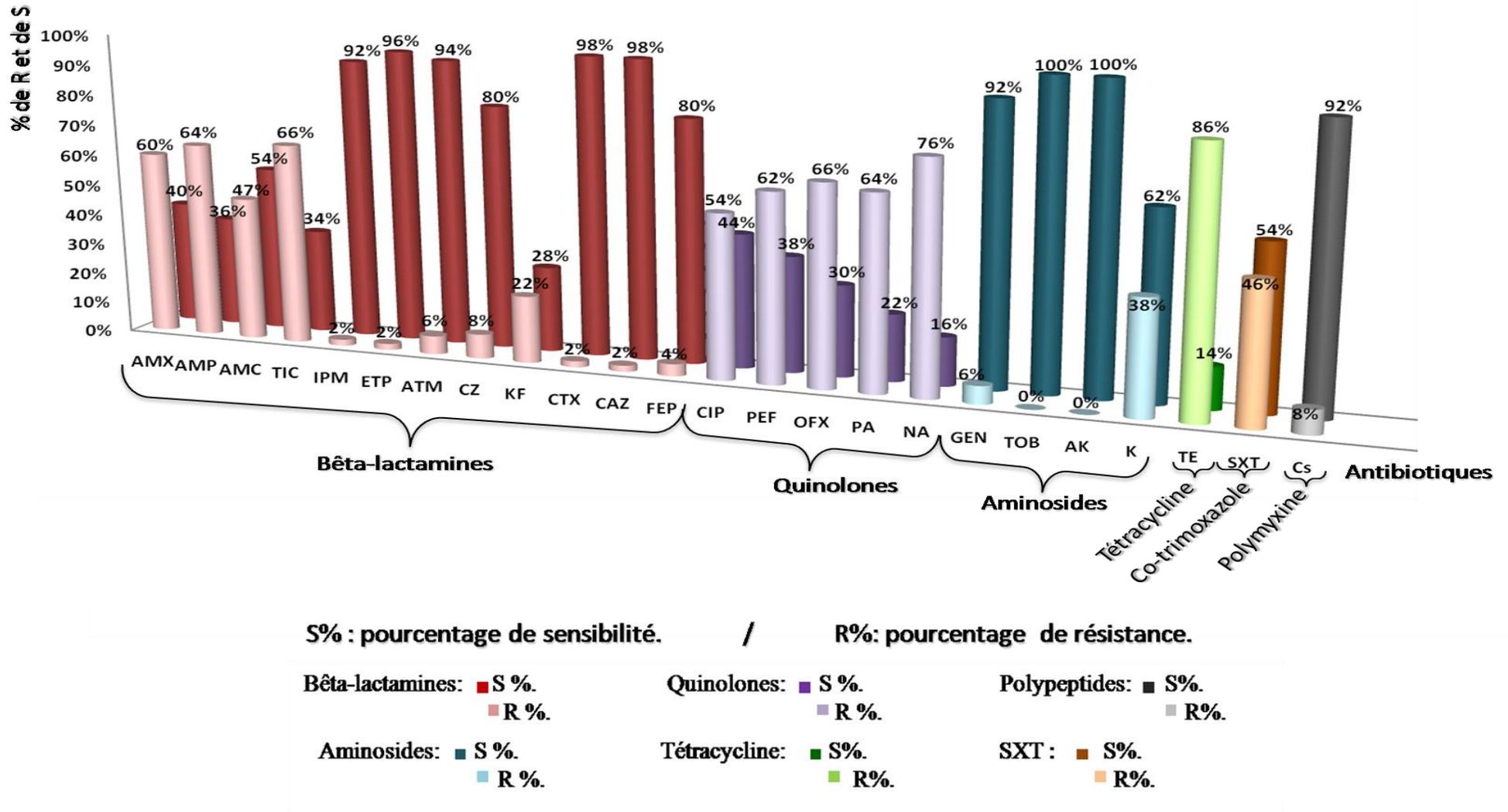


Figure 18: Taux de résistance et de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*E. coli*

Résultats et discussion Résultats

La répartition des souches selon le nombre de résistance et de sensibilité, en groupes d'intervalle de 5, est représentée dans la figure 19. Chaque groupe renferme le pourcentage de souches dont le nombre de résistances et de sensibilités est compris dans l'intervalle lui correspondant.

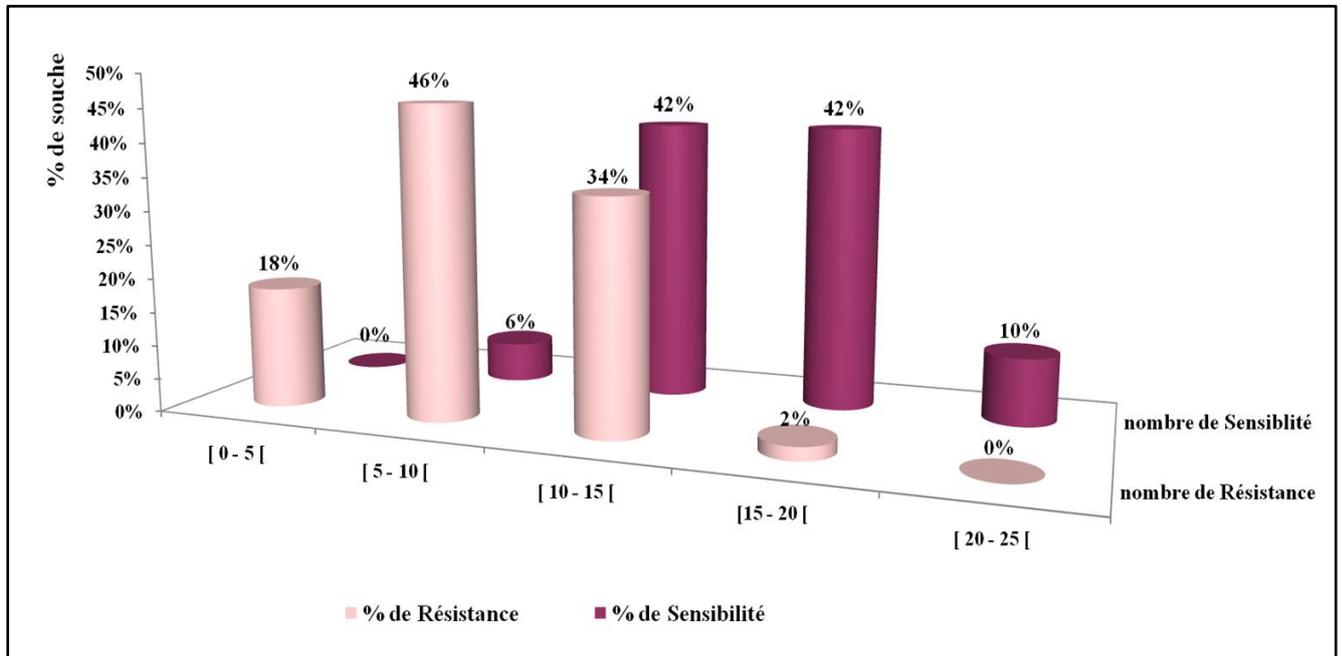
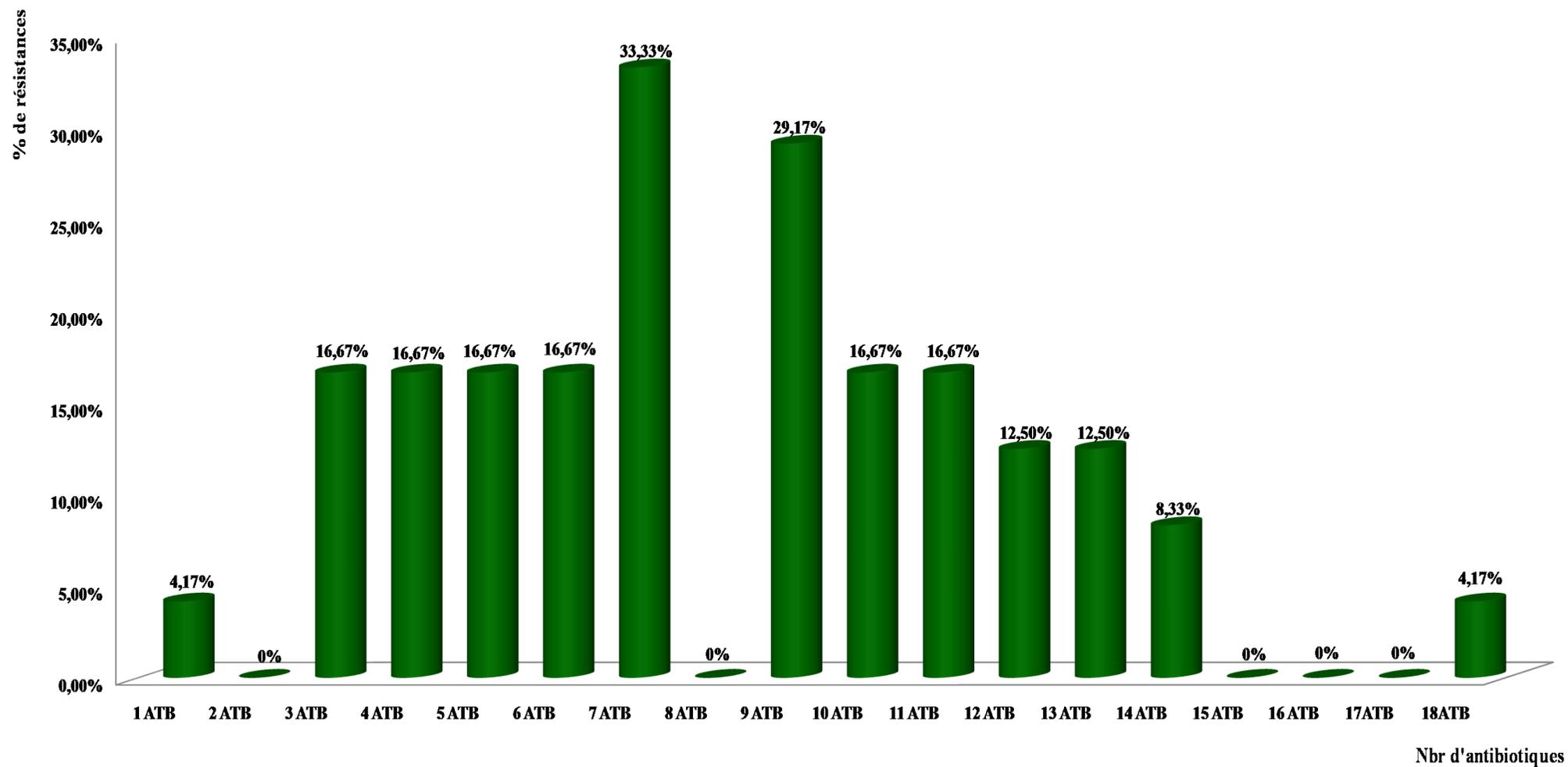


Figure 19 : Répartition des souches en groupes en fonction du nombre de résistance et de sensibilité.

Sur l'ensemble des souches résistantes, 98% des souches testées sont multi-résistantes. Cette multi-résistance est comprise entre 3 et 18 antibiotiques avec des taux de 16,67% et 4,17% respectivement. La résistance à 7 antibiotiques est la plus fréquemment observée avec un taux de 33,33%. Des souches mono-résistantes ont aussi été observées sur 4,17% des souches (Figure 20).



ATB : antibiotique.

Figure20 : Variation des pourcentages de souches résistantes en fonction du nombre d'antibiotiques

Résultats et discussion Résultats

Concernant, la recherche des bêta-lactamases à spectre élargi, aucun effet de synergie entre les disques d'amoxicilline-acide clavulanique et de cefotaxime (céphalosporine de troisième génération) ainsi que de l'aztreoname n'a été observé. Par contre, le profil majoritaire observé a concerné le profil pénicillinase haut niveau.

Quelques résultats d'antibiogrammes sont illustrés dans la figure ci-dessous.

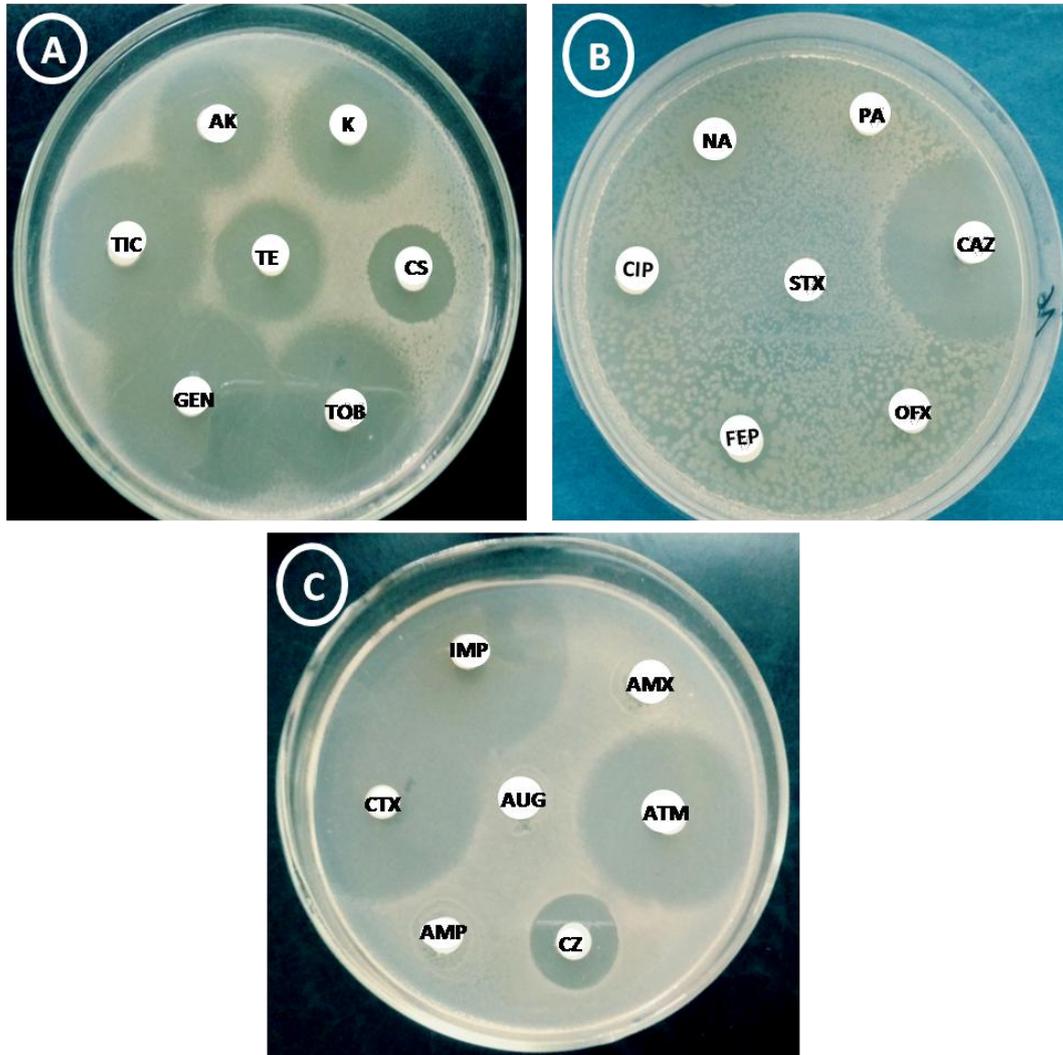


Figure 21 : Quelques photos illustrant les résultats des antibiogrammes.

A : les Aminosides, Bêta-lactamine, Tétracycline et Polymyxine ;

B : les Quinolones et Fluroquinolones, bêta-lactamine et Co-trimoxazole ;

C : les Bêta-lactamines.

1.4. Conjugaison bactérienne

Les essais de transfert de gène codant pour la résistance à l'amoxicilline, par conjugaison bactérienne, ce sont révélés positifs pour toutes les souches testées, cela signifie que le support génétique de cette résistance est plasmidique.

Par contre, les résultats du transfert de gène codant pour l'acide Nalidixique, se sont avérés positifs seulement chez deux souches sur les quatre testées. Ce qui suppose que le support génétique de ces deux souches est plasmidique ; ce n'est pas le cas des deux autres souches, qui elles ont un support génétique chromosomique.

Les prises de vue ci-dessous représentent les résultats des essais de conjugaison.



Figure 22: Transconjugants issus du transfert de la résistance à l'amoxicilline observés sur milieu MH additionné d'amoxicilline et azide de sodium (AMX-AZ).

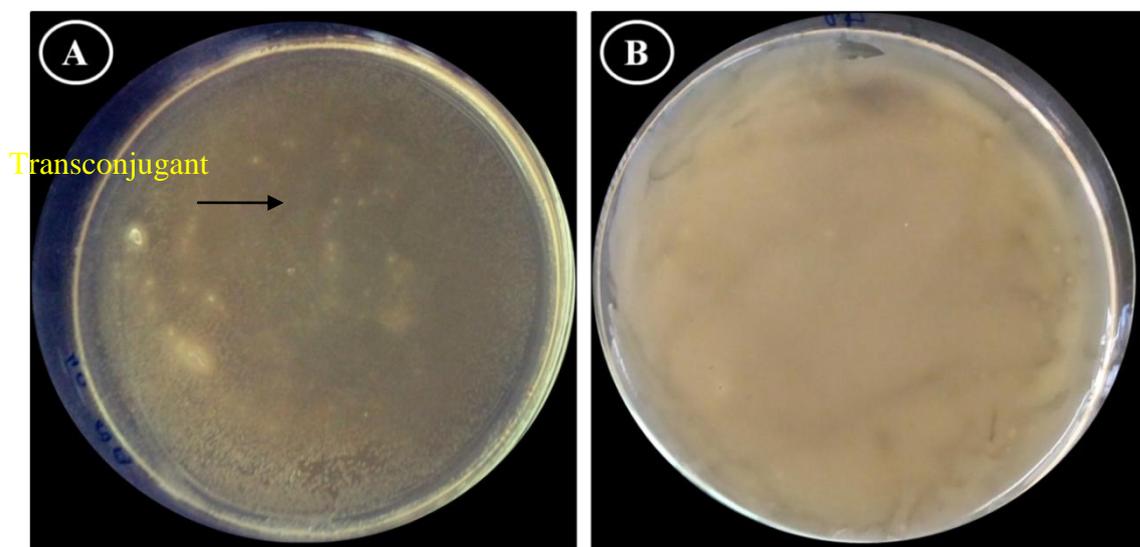


Figure 23: Photos illustrant les résultats du transfert des caractères de résistance à l'acide Nalidixique.
A : Transconjugant résistant à l'acide Nalidixique ;
B : Pas de transfert du gène codant pour l'acide Nalidixique.

1.5. Facteurs de virulence

La quasi majorité des souches aviaires issues de lésions de colibacillose, se sont avérées résistantes au sérum (96%), contre seulement 4% de sensibilité. Par ailleurs, 42% des souches d'*E.coli* étudiées se sont révélées fixatrices du rouge Congo, alors que 58% semblent inaptés (voir figure 24).

De même, l'ensemble des souches d'*E.coli* sont avérées posséder une hémolysine : 68% des souches testées serait productrices d'une hémolysine β et 32% d'une hémolysine α (voir figure 24).

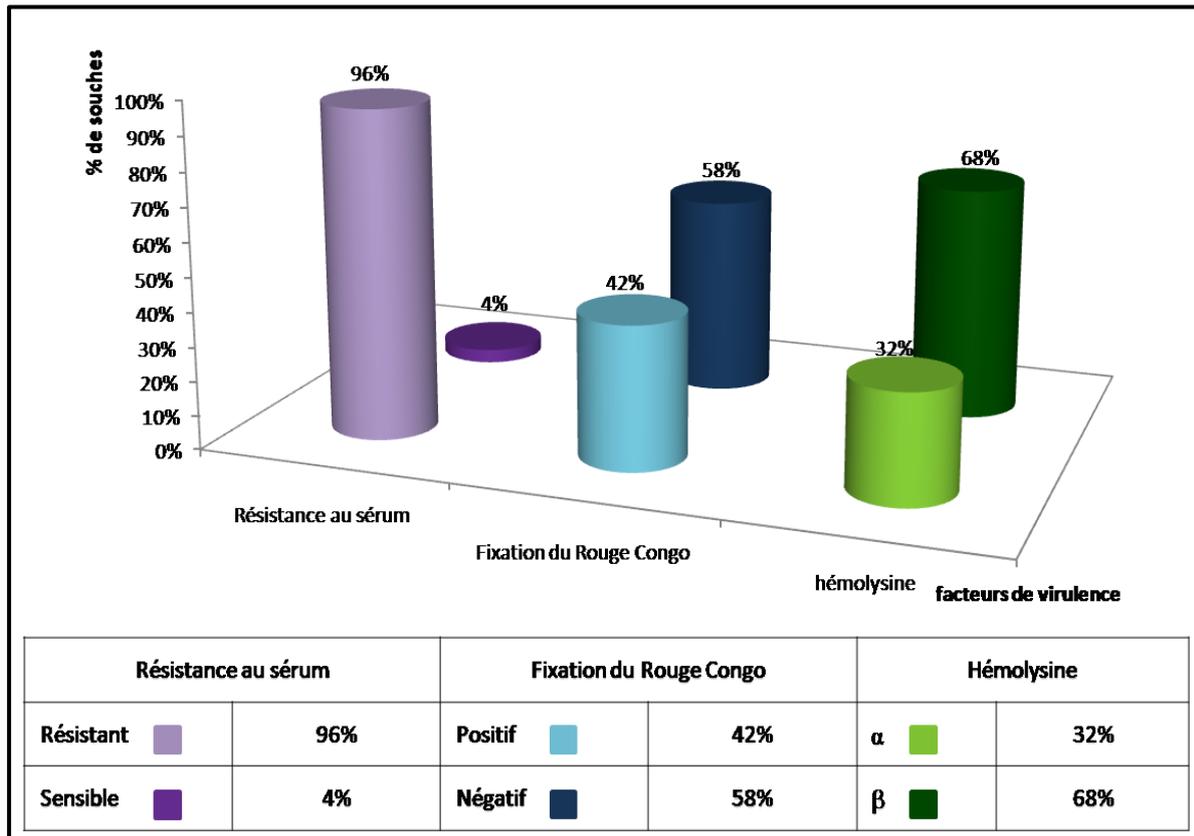


Figure 24: Résultats de la recherche phénotypique des facteurs de virulences.

Pour une meilleure étude de la virulence, la coexistence de facteurs de virulence a été recherchée au sein d'une même souche. Il a été constaté que chaque souche possédait 2 ou 3 facteurs simultanément, celles qui en possédaient 2 étaient les plus dominantes avec un taux de 62% ; alors que, les souches qui avaient 3 facteurs étaient moins fréquentes (38%) (Voir figure 25).

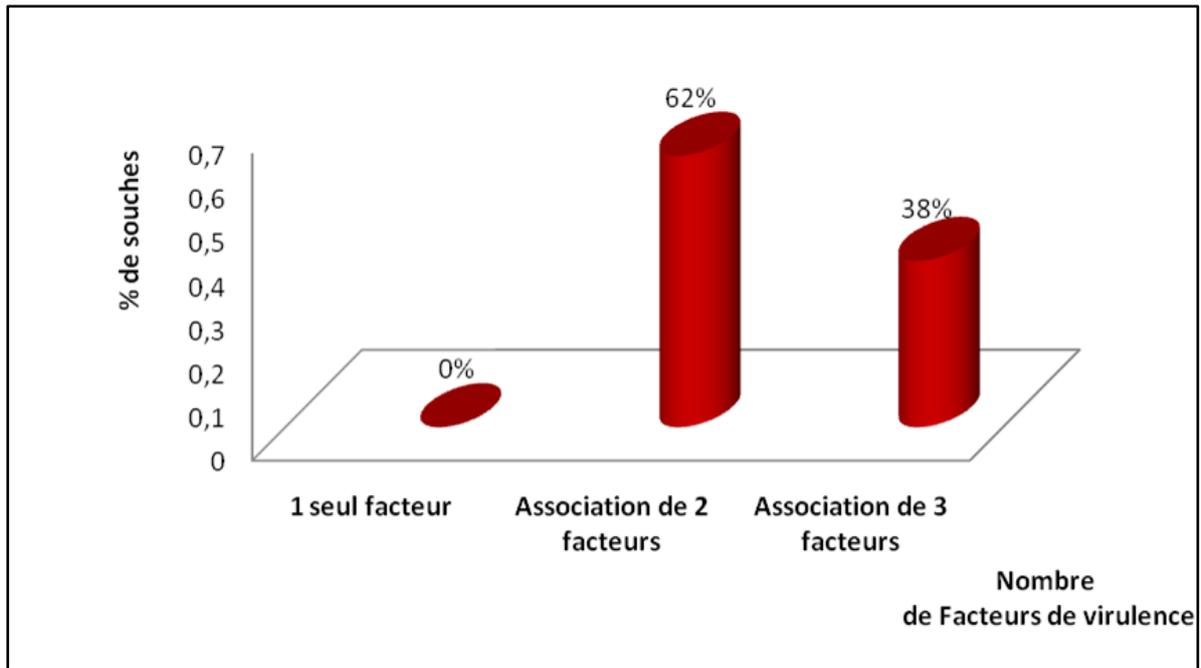


Figure 25: Pourcentage des souches en fonction du nombre de facteur de virulence associé.

Les prises de vue ci-dessous représentent les résultats de la recherche des facteurs de virulence

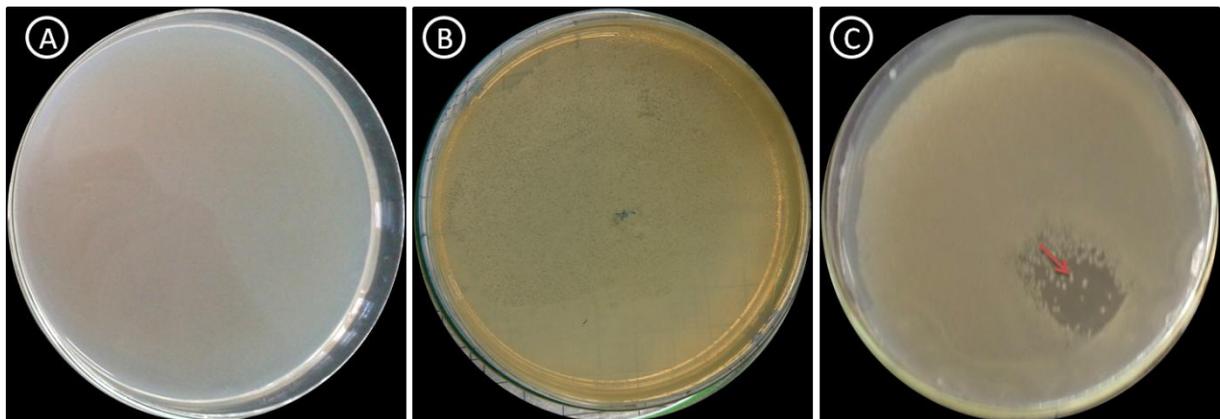


Figure 26: Photos illustrant la recherche de la résistance au sérum.

A : une boîte témoin MH non ensemencé ; B : développement d'une souche qui résiste au sérum ; C : développement d'une souche qui est sensible au sérum.

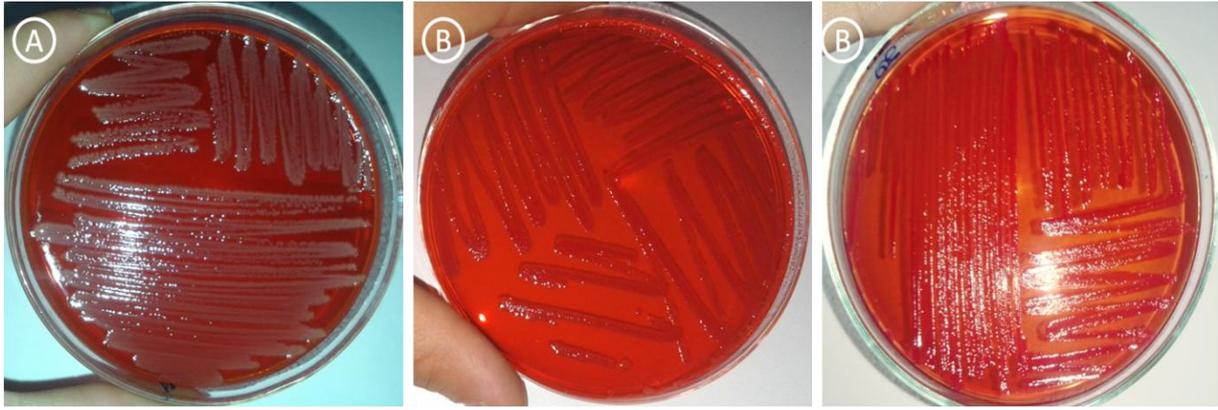


Figure 27 :Photos illustrant la recherche de la fixation du rouge Congo.
A : souche non fixatrice du rouge Congo ;B : souche fixatrice du rouge Congo.

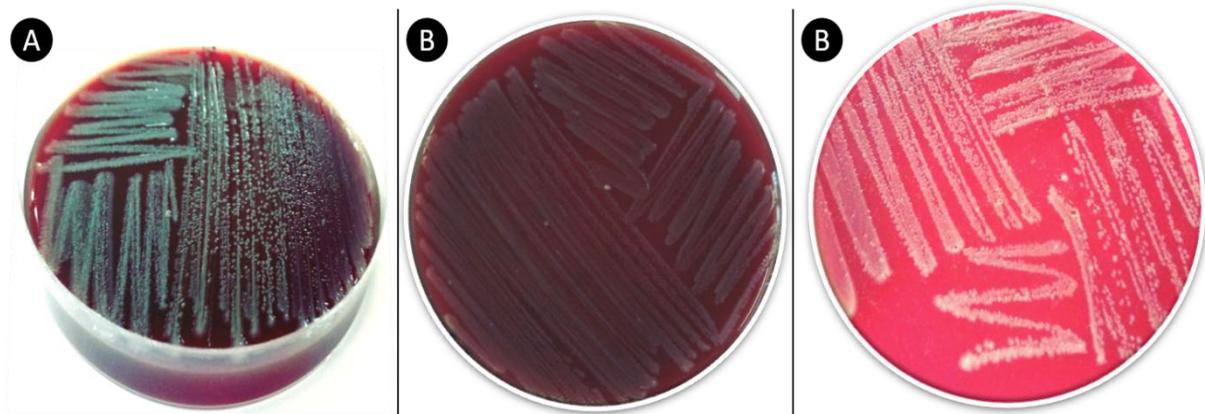


Figure 28 :Photos illustrant les résultats des tests de l'hémolysine.
A : Hémolysine α ; B : Hémolysine β .

1.6. Résultat de l'analyse statistique

Le résultat du test de Khi-deux est illustré dans la figure ci-dessous :

```
Pearson's Chi-squared test  
data: ATB and virulence  
X-squared = 283.0193, df = 48, p-value < 2.2e-16
```

Figure 29 : Résultat du test d'indépendance de Khi-deux (sous le logiciel R).

$p\text{-value} < 2.2 \times 10^{-16}$; donc $< 5\%$, l'hypothèse H_0 est donc rejetée et H_1 (existe un lien entre l'antibiorésistance et la virulence) est acceptée.

Ce résultat nous confirme l'existence d'une corrélation entre l'antibiorésistance et la virulence des souches étudiées.

Discussion

2. Discussion

La montée en puissance des bactéries résistantes aux antibiotiques constitue un problème de santé publique dans le monde entier. Au niveau national, très peu de travaux ont été effectués dans le sens de la recherche ou de la surveillance de l'évolution, de l'émergence et la propagation de ces bactéries tant en Médecine humaine que vétérinaire. Dans cette dernière, en particulier dans la filière aviaire, très peu de données sont disponibles sur le comportement des souches d'*E. coli* aussi bien fécales que pathogènes.

L'étude des profils d'antibio-résistance de 50 souches d'*E. coli* d'origine aviaire potentiellement pathogènes, indique que l'ensemble des souches testées sont révélées résistantes avec 98% de multirésistances. Des taux de multirésistances également élevés ont été signalés par MEGUENNI (2016) sur une collection de 308 APEC (70,12%) et LAAREM *et al.* (2017) sur une collection de 33 isolats d'*E. coli* (96,55%).

Concernant les bêta-lactamines, des taux de résistance importants ont été obtenus pour les aminopénicillines, avec 60% et 64% de résistance à l'amoxicilline et l'ampicilline respectivement. Des taux de résistance moins élevés ont été signalés par HAMMOUDI *et al.* (2009), au niveau de l'ouest Algérien avec 47% de résistance à l'amoxicilline et l'ampicilline. Ceci alors qu'en 2010, au niveau de la même région, AGGAD *et al.* n'ont noté aucune résistance à l'ampicilline. Des niveaux de résistance plus élevés, 84,5% et 87,8% pour l'amoxicilline et l'ampicilline respectivement, ont été signalés par MESSAÏ *et al.* (2013) dans l'est Algérien, à Sétif. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau du centre Algérien et de l'est Algérien respectivement, par MEGUENNI (2016), avec 60,1% de résistance à l'amoxicilline, 60,2% de résistance à l'ampicilline et par LAAREM *et al.* (2017) avec 65,5% de résistance à l'amoxicilline.

Il est nécessaire de signaler que globalement, les taux de résistance obtenus pour l'amoxicilline et l'ampicilline sont proches voire identiques ; cela a été observé en Algérie à répétitions au cours des années précédentes par HAMMOUDI *et al.* (2009), MESSAÏ *et al.* (2013) et par MEGUENNI (2016). Cela peut être dû à l'utilisation simultanée et abusive de ces molécules dans le secteur avicole.

Les taux de résistance varient d'un pays à un autre. Au Maroc, HAFED *et al.* (2016) et RAHAMATALAH *et al.* (2016) ont signalé un niveau élevé de résistance de souches d'*E. coli* aviaires prélevées de différents organes vis-à-vis l'amoxicilline, avec des taux respectifs de 88,23% et 90,1%. Par contre au Sénégal, SOUMAILA GARBA (2012) n'a enregistré aucune résistance de souches, issues de colibacillose, vis-à-vis l'amoxicilline, mais

un haut niveau de résistance pour l'ampicilline (78%). En Chine, un taux de résistance élevé à l'ampicilline a été observé (97,7%) (LI *etal.*, 2015), ce qui n'est pas le cas au Brésil où la résistance à l'ampicilline est plus modérée (21%) (BORGES *etal.*, 2016).

La résistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique observée est assez importante, atteignant un taux de 47%, alors qu'un taux de résistance moindre (27%) a été enregistré par MEGUENNI en 2016. LAAREM *etal.* ont rapporté une faible résistance pour cette association avec 6,9%, en 2017. La variation de ces taux de résistance serait due à la différence des modes d'utilisations de cette molécule au niveau des élevages avicoles Algériens.

Au Brésil, BORGES *etal.* (2016) ont enregistré un taux de résistance moyen pour l'amoxicilline-acide clavulanique, de l'ordre de 15,8%.

Dans cette étude, une seule carboxy-pénicilline a été utilisée, la ticarcilline. Nos souches se sont avérées souvent résistantes à cette molécule avec un taux de résistance important estimé à 66%. En 2016, MEGUENNI a obtenu un résultat similaire avec 59,6% de résistances. Par contre, la résistance des souches étudiées aux céphalosporines de 1^{er} et de 3^{ème} génération s'est révélée faible avec respectivement 8% pour la céfazoline et 2% pour le Céfotaxime et la Céfotazidime. En comparaison, des résultats légèrement plus élevés ont été enregistrés par MEGUENNI (2016) avec les taux suivants : céfazoline (31,3%), Céfotaxime (8,8%) et Céfotazidime (9,2%).

A travers le monde, des taux de résistance nettement plus élevés ont été observés pour les céphalosporines de 1^{ère} et 3^{ème} génération, avec 60% pour la céfalotine et 58,6% vis-à-vis de la céfotaxime, au Maroc et en Chine, respectivement dans les études de HAFED *etal.* (2016) et LI *etal.* (2015).

Les faibles taux de résistance aux carbapénèmes et aux monobactames sont aussi à signaler avec 2% pour l'imipénème et 6% pour l'aztreonam ; des résultats proches ont été rapportés par MEGUENNI (2016), une efficacité totale de l'imipénème et un bas niveau de résistance à l'encontre de l'aztreonam (10%). Ces faibles taux de résistance reflètent l'utilisation modérée de ces molécules en élevage avicole.

La résistance à la famille des quinolones a été observée avec des taux de résistance relativement élevés avec de 76%, 64%, 62% et 66% respectivement pour l'acide Nalidixique, l'acide pipimédique, pefloxacin et l'ofloxacin. De même pour les fluoroquinolones avec un taux de résistance de 54% pour la ciprofloxacine.

En 2013, MESSAI *etal.* ont signalé un niveau de résistance très élevé à l'acide Nalidixique avec 96,7%. Les résistances aux quinolones et fluoroquinolones rapportés par 3 études

Algérienne suivent le même ordredécroissant que nos résistances avec : 86%, 80%, 51,4% de résistance pour l'acide Nalidixique, l'ofloxacin et la ciprofloxacine respectivement pour AGABOU *etal.* (2015) ; des taux de 55,2%, 41,8%, 17%, 26,1% et 19% de résistance vis-à-vis l'acide nalidixique, l'acide pipimédique, pefloxacine, l'ofloxacin et la ciprofloxacine respectivement (MEGUENNI, 2016) et 72% de résistance à la ciprofloxacine d'après LAAREM *et al.*, 2017. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'utilisation anarchique et intensive de ces antibiotiques en médecine vétérinaire.

Au niveau international, les niveaux de résistance aux quinolones et fluoroquinolones varient de moyennement élevé à très élevé ; ainsi, des taux de 14% et 31,6% vis-à-vis la ciprofloxacine ont été notés au Sénégal et au Brésil par SOUMAILA GARBA (2012) et BORGES *et al.* (2016) respectivement. Alors que LI *et al.* (2015) en Chine ont signalé un taux de résistance de 94,3% pour ce même antibiotique et 94,3% pour l'ofloxacin. Les taux de résistance à l'acide Nalidixique rapportés par HAFED *etal.* (2016) au Maroc, SOUMAILA GARBA (2012) et BORGES *etal.* (2016) sont moyennement élevés avec 50,20%, 48%, 52,6% respectivement.

Les antibiotiques de la famille des aminosides se sont avérés les plus efficaces, comparativement aux bêta-lactamines et aux quinolones. Ces antibiotiques seraient relativement peu ou pas utilisés en aviculture, ce qui expliquerait les résultats observés. Toutes les souches testées vis-à-vis de l'amikacine et la tobramycine ont été sensibles à ces derniers. Des taux de résistance moyens vis-à-vis la kanamycine sont à noter avec 38% et un faible taux de résistance vis-à-vis la gentamicine (6%). Les niveaux de résistance à la gentamicine signalés par AGGAD *etal.* (2010) ; MESSAÏ *etal.* (2013) et MEGUENNI (2016) sont eux aussi faibles avec 3% ; 5,5% et 1,4% respectivement. Un taux de résistance moyen vis-à-vis de la kanamycine a été enregistré par MEGUENNI (2016) avec 17,6%.

En 2017, un faible taux a aussi été obtenu par LAAREM *et al.* vis-à-vis la tobramycine avec 3,4%.

Le même constat a été fait au Sénégal. En effet, SOUMAILA GARBA (2012), a enregistré de très bas niveaux de résistance vis-à-vis l'amikacine, la gentamicine et la kanamycine, avec 0% ; 5% et 7% respectivement. Ce n'est pas le cas dans d'autres pays : des niveaux de résistance plus élevés ont été notés au Maroc et au Brésil avec des taux respectifs de 24,8% (RAHAMATALAH *etal.*, 2016) et 21% (BORGES *etal.*, 2016). En Asie, des taux très alarmants ont été signalés, en particulier en Chine par LI *etal.* (2015), pour la kanamycine, l'amikacine et la gentamicine avec 95,4%, 52,9% et 93,1% respectivement.

Concernant l'association Triméthoprime et sulfaméthoxazole, les souches étudiées ont montré un taux moyen de résistance de 46%, ce qui concorde avec les résultats de HAMMOUDI et AGGAD, (2008) et MEGUENNI, (2016) à savoir 42% et 41,9% respectivement. Par contre, des résistances significativement élevées ont été rapportées par AGGAD *etal.*(2010) ; MESSAÏ *etal.* (2013) et LAAREM *etal.*(2017) avec les taux respectifs de : 70%, 82,2% et 96,6%.

Au niveau Africain, des taux de résistance élevés vis-à-vis de l'association Triméthoprime et sulfaméthoxazole ont été observés par RAHAMATALAH *etal.* (2016) au Maroc et par SOUMAILA GARBA (2012) au Sénégal, avec 67,56% et 65% respectivement. Tandis qu'au Brésil, une baisse de ce taux (36,8%) a été signalée par BORGES *etal.* (2016).

Dans cette étude, la tétracycline s'est révélée inefficace sur la quasi-totalité des souches testées avec un taux de résistance de 86% ; ceci concorde avec les taux de résistance (96,6%) enregistrés lors de l'étude de LAAREM *etal.* (2017), alors qu'en 2016, MEGUENNI a obtenu un taux moyen de 28,4% dans son étude sur des souches de la région Centre Algérien. Au Sénégal, les souches étudiées par SOUMAILA GARBA (2012) se développent avec succès en présence de la tétracycline, avec un niveau de résistance de 95%. Cependant, au Brésil, cette molécule reste moyennement active avec 52,6% de résistances.

Le taux de résistance développé vis-à-vis la colistine est faible (8%). Ce résultat est renforcé par des travaux antérieurs effectués par HAMMOUDI *et al.* (2009) ; MESSAÏ *et al.*(2013) ; MEGUENNI (2016). Ainsi, la colistine pourrait être une alternative intéressante à la résistance aux antibiotiques et demeure en Algérie, une molécule de dernier recours. Ceci n'est pas le cas du Maroc, où les résultats des études algériennes s'opposent aux résultats Marocains. En effet, l'étude de HAFED *etal.* (2016) a révélé un taux de résistance des plus alarmants (87,41%) vis-à-vis de la colistine.

L'analyse du profil de résistance aux bêta-lactamines a montré que le profil majoritaire observé chez les 50 souches testées, appartient au profil producteur de Pénicillinase haut niveau. Aucune souche productrice de BLSE n'a pu être décelée. Ceci va dans le sens des résultats récents de LAAREM *et al.* (2017), dans l'Est Algérien, qui n'a décrit aucune BLSE sur une collection de 33 souches testées. En effet, ce type de phénomène reste rare

dans les communautés microbiennes présentes au niveau des élevages avicoles Algérien, si l'on s'en tient à la rareté des travaux sur l'antibiorésistance en filière aviaire. La seule description faisant référence à la présence de BLSE de type CTX-M dans cette filière a été effectuée sur une caractérisation de 11 souches d'*E.coli* du centre Algérien issues de colibacillose (MEGUENNI *et al.*, 2015).

Une étude phénotypique de la virulence a révélé que nos souches sont bien virulentes. En effet, elles se sont avérées toutes résistantes au sérum. De plus, une production récurrente d'hémolysine a été observée (100%) : 32% des souches produisent une hémolyse α et 68% seraient productrices d'une hémolysine β . Ceci alors que seules 42% des souches se sont avérées fixatrices du rouge Congo.

Ces résultats ne s'opposent à ceux obtenus par AL-SAIEDI et AL-MAYAH (2014), dans une étude similaire en Iraq. Ces auteurs ont observé une fréquence de production d'hémolysine moyenne (37,03%) et une assez grande aptitude à fixer le rouge Congo (60%) chez les souches étudiées.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Ce travail a consisté à évaluer par l'antibiogramme la sensibilité aux antibiotiques de souches aviaires d'*Escherichia coli*(50) de la région centre, issues majoritairement de lésions de colibacillose et de détecter la présence de trois facteurs de virulence (résistance au sérum, hémolysine et fixation du Rouge Congo) associée à ces souches.

Il ressort à travers cette étude, que des taux de résistance variables ont été observés vis-à-vis des antibiotiques utilisés. Les antibiogrammes observés ont révélé des taux de résistance élevés notamment pour les bêta-lactamines, quinolones et tétracycline.

Concernant les bêta-lactamines, les taux de résistance les plus élevés ont été obtenus vis-à-vis de la ticarcilline, l'ampicilline et l'amoxicilline avec 66%, 64% et 60% respectivement. De hauts niveaux de résistance ont été observés à l'encontre des quinolones avec 76%, 66% et 54% respectivement pour l'acide Nalidixique, l'ofloxacine et la ciprofloxacine.

Il est important de signaler que le taux de résistance le plus élevé a été enregistré pour la tétracycline avec 86%. Cependant certaines molécules demeurent actives telles que la colistine, la tobramycine et l'imipénème.

Les essais de transfert par conjugaison ont mis en évidence la nature plasmidique de la résistance à l'amoxicilline sur l'ensemble de souches testées et ainsi confirmé la présence d'une pénicillinase haut niveau à médiation plasmidique. Par ailleurs, le caractère de résistance à l'acide Nalidixique s'est révélé transférable pour deux souches testées et chromosomique pour deux autres.

La recherche phénotypique de facteurs de virulence a révélé que les souches testées sont potentiellement virulentes. En effet, la quasi-totalité des souches sont résistantes au sérum et productrices de l'hémolysine : 68% des souches testées ont produit une hémolysine β et 32% une hémolyse α . De plus, 96% des souches se sont avérées résistantes au sérum et 42% sont fixatrices du Rouge Congo. Par ailleurs, 38% des souches possèdent les trois facteurs de virulences simultanément.

Dans la présente étude, une corrélation entre l'antibiorésistance et la virulence des souches d'APEC étudiées a été établie et ce, sur la base de la p-value du test khi-deux.

Les APEC se caractérisent par leurs diversités en matière de facteurs de virulence. Ainsi différents isolats peuvent abriter différentes associations de ces derniers ; aucun profil de virulence n'a été proprement établi, ce qui explique qu'à l'heure actuelle aucun vaccin efficace n'est disponible.

Conclusion

Le traitement de la colibacillose repose sur l'antibiothérapie ; cependant, l'utilisation abusive et anarchique des antibiotiques a modifié l'évolution naturelle des bactéries, en augmentant les fréquences des bactéries résistantes, voir multirésistantes. Ceci a par conséquent souvent compromis l'efficacité des traitements administrés en filière aviaire.

Le seul moyen de faire face à cette situation serait de retarder l'émergence et la diffusion ultérieure de bactéries résistantes ou de gènes de résistance. Il est donc important, entre autres mesures d'urgence, d'instaurer une législation plus rigoureuse et de veiller à la respecter et l'appliquer.

De même, il est important de sensibiliser toutes les personnes impliquées à tous les niveaux dans l'administration d'antimicrobiens aux animaux et d'inclure un programme de formation des éleveurs car la plupart des aviculteurs ne sont pas des professionnels et ne maîtrisent pas l'application des règles d'hygiène fondamentales.

Il serait vivement recommandé de limiter l'utilisation des antibiotiques surtout dans le cas de promoteurs de croissance, en raison du risque de résidus entrant dans la chaîne alimentaire et du potentiel d'évolution des souches résistantes.

Enfin, cette étude gagnerait à être complétée par une confirmation moléculaire des déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques et de la virulence. De même, il serait intéressant de déterminer les mécanismes sous-jacents à l'antibiorésistance et à la virulence de ces souches APEC.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ABREU A. G. and BARBOSA A. S. (2017). How *Escherichia coli* Circumvent Complement-Mediated Killing. *Frontiers in Immunology* 8: 452.

AGABOU A., LEZZAR N., OUCHENANE Z., KHEMISSI S., SATTI D., SOTTO A., LAVIGNE J. -P and PANTEL A. (2015). Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.

AGGAD H., AMMAR Y. A., HAMMOUDI A. and KIHAL M. (2010). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis. *Global Veterinaria* 4 (3): 303-306.

AL-SAIEDI R. L. R. and AL-MAYAH A. A. S. (2014). Pathogenicity Testing of Several APEC Isolates Obtained from Naturally Infected Broiler Birds Reared in Basrah. *International Journal of Poultry Science* 13 (7): 374-378.

ALONSO C. A., ZARAZAGAA M., BEN SALLEMB R., JOUINIC A., BEN SLAMAB. and TORRESA C. (2017). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals. *Lett Appl Microbiol*. 64(5):318-334.

ANTÃO E-M., GLODDE S., LI G., SHARIFI R., HOMEIER T., LATUMUS C., DIEHL I., BETHE A., PHILIPP H-C., PREISINGER R., WIELER L-H. and EWERS C. (2008). The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microbial Pathogenesis* 45 : 361–369.

BAKOUR R., LAROCHE Y. and CORNELIS G. (1983). Studies of the incompatibility and replication of the 70kb virulence plasmides of *Yersinia*. *Plasmide*. 10: 279-289.

BECEIRO A., TOMAS M. and BOU G. (2013). Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?. *Clinical Microbiology Reviews* p. 185-230.

BEN YOUSSEF S., BELGUITH J. et HADIJI R. (2016). Les bêta-lactamines en médecine vétérinaire. *Ecole nationale de médecine vétérinaire SIDI THABET*.

BORGES C. A., MALUTA R. P., CARDOZO M. V., BARBOZA K. B., GUASTALLI E. A.L., KARIYAWASAM S., DEBROY C. and AVILA F. A. (2016). Multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from wild birds in a veterinary hospital. *Avian Pathology* 1465-3338.

Références bibliographiques

- BRYSKIER A., ACAR J., CLAUSER M. et MOREILLON PH (1999).** Antibiotiques : agents antibactérien et antifongiques. Edition Ellipses. 1999 Paris
- CARLE S. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important !.Pharmactuel Vol. 42 Supplément 2.
- CHARDON H. et BRUGERE H. (2014).** Usages des antibiotiques en élevage et filièresviandes. Consulté en ligne : www.civ-viande.org
- CHASLUS-DANCLA E. (2001).** Présentation de la transversalité « Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage. Institut national de la recherche agronomique (chaslus@tours.inra.fr).
- COURVALIN P. (2016).** Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease?.ClinicalMicrobiology and Infection 22(5):405-7.
- COURVALIN P., GOLDSTEIN F. PHILIPPON et SIROT J. (1985).** L'antibiogramme Ed. MPC- Vigot. Paris-Bruxelles.
- COURVALIN P. et LECLERCQ R. (2012).**ANTIBIOGRAMME.EDITION ESKA.
- CUNHA M. P. V., DE OLIVEIRA M. G. X., DE OLIVEIRA M. C. V., DA SILVA K. C., GOMES C. R., MORENO A. M. and KNOBL T. (2014).** Virulence Profils, Phylogenetic Background, and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Turkeys with Airsacculitis. Scientific world journal 14: 289024.
- CUNHA M. P. V., SAIDENBERG A. B., MORENO A. M., FERREIRA A. J. P., VIEIRA M. A. M., GOMES T. A. T. and KNOOBL T. (2017).**Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazi.PLoS One12(6):e0178970.
- DA SILVA G. J. andMENDONÇA N. (2012).**Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. Virulence 3(1): 1-11.
- DENAMUR E. and PICARD B. (2012).** Virulence and resistance: two antagonistic properties in *Escherichia coli*?.Réanimation 21:249-251.
- DOI Y., LOVLEVA A. and BONOMO R. A. (2017).**The ecology of extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) in the developed world.Journal of Travel Medicine, Vol 24, Suppl 1, S44–S51.

Références bibliographiques

- DZIVA F. and STEVENS M. P. (Août 2008).**Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. Avian Pathology 37(4): 355-366.
- EBONGUE C.O., TSIAZOK M. D., MEFO'O J. P. NGABA G.P., BEYIHA G.et ADIOG O. (2015).**Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012. Pan African Medical Journal – ISSN: 1937-8688.
- ELHANI D. (2012).**The widening challenge of extended spectrum-lactamases. Annales de Biologie Clinique 70 (2) : 117-40.
- EWERS C., JANSSEN T. and WIELER L. H. (2003).**Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Berl Munch Tierarztl Wochenschr 116(9-10):381-95.
- EWERS C., BETHE A., SEMMLER T., GUENTHER S. and WIELE R. (2012).**Extended-spectrum b-lactamase-producing and *AmpC*-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clin Microbiol Infect 18: 646–655
- FIERER J., FINLAY F. and BRAUNE A. L. (1972).**A plaque assay on agar for detection of Gram negative bacilli sensitive to complement. I. Immunology 109, 1156.
- GARZA D. A., RILEY S. P. and MARTINEZ J. J. (2017).**Expression of Rickettsia Adr2 protein in *E. coli* is sufficient to promote resistance to complement-mediated killing, but not adherence to mammalian cells. PLoS One. (6): 12.
- GUABIRABA R. and SCHOULER C. (2015).** Avian colibacillosis: still many black holes. FEMS Microbiology Letters 362 fmv118.
- HAFED Z., BENGUEDOUR R., ABOUSSALEH Y., ZEGHARI L., AOUANE M., BERRID N., ABOUCHOUAIB N. and SBAIBI R. (2016).** Antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* of avian origin: broiler case in the region of grand Casablanca-Morocco. The American Journal of Innovative Research and Applied Sciences 2(2):50-54.
- HAMMOUDI A. and AGGAD H. (2008).**Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria. Turk. J. Veterinaire-Animal-Science; 32(2): 123-126.

Références bibliographiques

- HAMMOUDI A., MOUATS A. et HALBOUCHE M. (2009).**Sérotypes, antibiorésistance et identification de gènes de virulence des *Escherichia coli* pathogènes dans les élevages avicoles en Algérie. Research Gate:40-47.
- HAWKINS J. P., GEDDES B. A. and ORESNIK I. J. (2017).**Common dyes used to determine bacterial polysaccharides on agar are affected by medium acidification. Can. Journal of Microbiology 1-14.
- JOHNSON T.J., WANNEMUEHLER Y., DOETKOTT C., JOHNSON S. J., ROSENBERGER S. C. and NOLAN L., K. (2008).**Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool.journal of clinical microbiology Vol. 46 No. 12 p. 3987–3996.
- JOLY B. et REYNAUD A. (2002).** Entérobactéries systématique et méthodes de diagnostic. Edition TEC & DOC.
- LA RAGIONE R. M. and WOODWARD M. J. (2002).** Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. Research in Veterinary Science 73: 27-35.
- LAAREM M., BARGUIGUA A., NAYME K., AKILAS A., ZEROUALI K., EL MDAGHRI N. and TIMINOUNI M. (2017).**Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria. J Infect Dev Ctries11(2):143-151.
- LABRO M-T.and BRYSKIER J-M. (2014).** Antibacterial resistance: an emerging ‘zoonosis’ ?. Expert Rev Anti Infect Ther 12(12):1441-61.
- LI Y., CHEN L., WU X. and HUO S. (2015).**Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. Poultry Science 94:601-611.
- LIU Y-Y., WANG Y., WALSH T. R., YI L-X., ZHANG R., SPENCER J., DOI Y., TIAN G., HUANG X., YU L-F., GU D., REN H., CHEN X., LV L., HE D., ZHOU H., LIANG Z., LIU J-H.and SHEN J. (2016).** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 16: 161–68.
- LOVE T. E. and JONES B. (2008).**Introduction to Pathogenic Bacteria. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems: 1-13.

Références bibliographiques

- MACIEL J. F., MATTER L.B., TRINDADE M. M., CAMILLO G., LOVATO M., DE AVIA BOTTON S. and CASTAGNA DE VARGAS A. (2017).** Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak. *MicrobialPathogenesis* 103 : 119e122.
- MAINIL J. (2003).** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : II) Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Médecinevétérinaire* 147 : 159-171.
- MAINIL J. (2013).** *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152 : 2-12.
- MARTEL J-L. et CHASLUS-DANCLA E. (2000).** Aspects pratiques de la résistance aux antibiotiques en médecine vétérinaire. 9^{ème} CEMI.
- MEGUENNI N. (2016).** Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez les souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires. Thèse doctorat en Sciences Biologiques: Microbiologie. Algérie. 176 pages.
- MEGUENNI N., LE DEVENDEC L., JOUY E., LE CORVEC M., BOUNAR-KECHIH S., BAKOUR R. and KEMPF I. (2015).** First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone-resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* clone in Algeria. *AvianDiseases* 59 :20-23.
- MELLATA M. (1998).** Etude phénotypique et génotypique de l'antibiorésistance et de la virulence de souches d'*Escherichia coli* bovines et aviaires isolées en Algérie. Thèse doctorat en Biologie : option Microbiologie. Algérie, p 112.
- MELLATA M., DHO-MOULIN M., DOZOIS C. M., CURTISS III R., BROWN P. K., ARNE P., BREE A., DESAUTELS C. and FAIRBROTHER J. M. (2003).** Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity. *INFECTION AND IMMUNITY* p. 536–540.
- MESSAÏ C. R., KHELEF D., BOUKHORS K. T., RADJI N., GOUCEM R. and HAMDI T. -M. (2013).** Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens affected by colibacillosis in Setif. *African Journal of Microbiology Research*, volume 7 (21): 2668-2672.
- MIAJLOVIC H. and SMITH S. G. (2014).** Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS MicrobiolLett* 354: 1-9.

Références bibliographiques

- NAKAZATO G., DE CAMPOS T. A., STEHLING E. G., BROCCHI M. and SILVEIRA W. D. D. (2009).** Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(7): 479-486.
- RAHMATALLAH N., NASSIK S., EL RHAFFOULI H., LAHLOU AMINE I. et EL HOUADFI M. (2016).** Détection de souches multi-résistantes d'*Escherichia coli* d'origine aviaire dans la région de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer. *Revue Mar. Science Agronomiques et Vétérinaire* 5 (2):96-102.
- ROBINEAU B. et MOALIC P. Y. (2010).** Colibacillosis, a current disease in poultry production. *Bull. Académie vétérinaire France* tome 163: 207-212.
- RONCO T., STEGGER M., HEIDEMANN OLSEN R., SEKSE C., BAN NORDSTOGA A., POHJANVIRTA T., LILJE., ANDERSEN P. S. and PEDERSEN K. (2017).** Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production Troels. *BMC Genomics* 18:13.
- SADEYEN J-R., KAISER P., STEVENS M. P. and DZIVA F. (2014).** Analysis of immune responses induced by avian pathogenic *Escherichia coli* infection in turkeys and their association with resistance to homologous re-challenge. *Veterinary Research* 45:19.
- SALMAN A., SHARAH U., RODRIGUEZ-DIAZ E., SHUFAN E., RIESENBERG K., BIGIO I. L. and HULEIHEL. (2017).** Detection of antibiotic resistant *Escherichia coli* bacteria using infrared microscopy and advanced multivariate analysis. *View article online* 10:22:58.
- SOUMAILA GARBA A., (2012).** Caractérisation phénotypique et génétique des *Escherichia coli* isolés des cas de colibacilloses aviaires au Sénégal. Thèse doctorat en médecine vétérinaire. Sénégal. 81 pages
- STORDEUR P. et MAINIL J. (2002).** La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.* 146 :11-18.
- STROMBERG Z. R., JOHNSON J. M., FAIRBROTHER J. M., KILBOURNE J., VAN GOOR A., CURTISS R. and MELLATA M. (2017).** Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS One* 12 (7).
- VAISH R., PRADEEP M., SETTY C. and KANDI V. (2016).** Evaluation of Virulence Factors and Antibiotic Sensitivity Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Extra intestinal Infections. *Cureus* 8(5): e604. **VIDIC J., MANZANO M., CHANG C-M. and JAFFREZIC-**

Références bibliographiques

RENAULT N. (2017). Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Veterinary Research* 48:11.

Les liens

ANONYME 01 : http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial_4.html

ANONYME 02: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/quinolones>

ANONYME 03: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je06.htm>

ANONYME 04 : <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Colistine>

ANONYME 05 : https://www.researchgate.net/figure/5628329_fig2_Fig-2-Chemical-structure-of-the-four-dominant-antibiotics-detected-in-the-Seine-River

ANONYME 06 : <http://www.scribub.com/limba/franceza/ANTIBIOTIQUES-ANTIBACTERIENNES23541257.php>

VAN BAMBEKE F. and TULKENS P. (2010). Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse 1. Antibiotiques 2. Antifongiques. Consulté en ligne : <http://www.farm.ucl.ac.be/FARM2233/syllabus-antibiotiques-antifongiques-2009.pdf>

Annexes

Annexe 01 : Matériel utilisé

Matériel biologique

204 souches aviaires, nous ont été fournies par le laboratoire régional de DBK. L'isolement et l'identification nous ont permis d'obtenir les 50 souches d'*E.coli* d'origine aviaires, qui ont fait l'objet de notre étude.

Matériel du laboratoire de microbiologie LABAB

Appareillage

- Bec Bunsen, vortex, agitateur et une plaque chauffante réglable.
- Réfrigérateur domestique, Bain marie.
- Balance électronique de précision 0,001g.
- Four Pasteur réglé à 150°C.
- Autoclave.
- Etuve réglé à 37°C.
- Spectrophotomètre.

verrerie

- Tubes en verre stérile : tube à essais, à hémolyse, tube de conservation.
- Tube falcon et éppendorf stériles.
- Boîtes de Pétri en verre stériles.
- Anse Pasteur à file droit et à boucle.
- Bêchers, Erlenmeyer, Entonnoir stériles.
- Pipettes graduées à 5ml stériles.
- Micropipette de 100-1000µl.
- Des embouts stériles.

Colorant et réactif

- Violet de gentiane.
- Fuchsine.
- Lugol.
- L'huile de vaseline.
- Alcool.
- le rouge Congo.
- Solution NaOH (1N).
- NaCl.

Agents sélectifs

- Antibiotique sous forme de disque et en poudre.
- Azide de sodium.

Annexe 02 :Milieux de culture et compositions

Bouillon cœur-cerveille (BHIB)

Composition en g/l d'eau distillée :

- Infusion de cervelle de veau 12,5 ;
- Infusion de cœur de bœuf 5 ;
- Protéase-peptone 10 ;
- Phosphate de disodique 2,5 ;
- Chlorure de sodium 5 ;
- Glucose 2 ;
- pH 7;
- Stérilisation 20 minutes à 120 °C.

Désoxycholate-Citrate-Lactose-Saccharose (DCLS)

Composition en g/l d'eau distillée :

- Peptone pepsique de viande 10 ;
- Lactose 10 ;
- Désoxycholate de sodium 0,5 ;
- Chlorure de sodium 5 ;
- Citrate de sodium 2 ;
- Rouge neutre 0,03;
- Agar bactériologique 15;
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C, égal à $7,1 \pm 0,2$;
- Ne pas autoclaver, mais il doit être utilisé le jour de sa préparation.

Urée-indole

Composition en g/l d'eau distillée :

- Tryptophane 3 ;
- Urée 20 ;
- Phosphate monopotassique 1 ;
- Phosphate bipotassique 1 ;
- Chlorure de sodium 5 ;
- Rouge de phénol 0,025;
- Alcool à 95°C 0,01 ml ;
- Stérilisation 20 minutes à 120 °C.

Bouillon nitraté

Composition en g/l d'eau distillée :

- Nitrate de potassium 1 ;
- Peptone de viande 10 ;
- Extrait de bœuf 5 ;
- Chlorure de sodium 5 ;
- Stérilisation 20 minutes à 120 °C ;
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C, égal à $7,2 \pm 0,2$.

Citrate de Simmons

Composition en g/l d'eau distillée :

- Chlorure de sodium 5 ;
- Citrate de sodium 2 ;
- Phosphate dihydrogène d'ammonium 1 ;
- Sulfate de magnésium 2 ;
- Bleue de Bromothymol 0,08 ;
- Agar bactériologique 15 ;
- Stérilisation 20 minutes à 120 °C ;
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C, égal à $6,9 \pm 0,2$.

Mueller-Hinton (MH)

Composition en g/l d'eau distillée :

- Infusion de viande de bœuf 2 ;
- Hydrolysant amidon 17,5 ;
- Amidon 1,5 ;
- Agar bactériologique 17 ;
- pH 7,4 ;
- Stérilisation 20 minutes à 120 °C.

Gélose de conservation

Composition en g/l d'eau distillée :

- Peptone 10 ;
- Extrait de viande 5 ;
- Chlorure de sodium 5 ;
- Agar bactériologique 10 ;
- Stérilisation 20 minutes à 120 °C ;
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C, égal à $7,3 \pm 0,1$.

Tryptase-Soja-Agar (TSA)

Composition en g/l d'eau distillée :

- Tryptone 15 ;
- Peptone papainique de soja 5 ;
- Chlorure de sodium 5 ;
- Agar bactériologique 15 ;
- Stérilisation 20 minutes à 120 °C ;
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C, égal à $7,3 \pm 0,2$.

Columbia

Composition en g/l d'eau distillée :

- Extrait de levure 3 ;
- Peptone de viande 5 ;

Annexes

- Peptone de soja 3 ;
- Tryptone 5 ;
- Cœur-cerveau 8 ;
- Amidon 1 ;
- Chlorure de sodium 5 ;
- Agar bactériologique 18 ;
- Stérilisation 20minutes à 120 °C ;
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C, égal à $7,3 \pm 0,1$.

Préparation de la gélose Columbia additionné de sang :

- Une certaine quantité de gélose Columbia est préparée puis autoclavée ;
- Après autoclavage, attendre que la température de la gélose baisse, qu'elle tiédise pour ajouter le sang (50ml pour 1L de gélose) ;
- Bien homogénéiser le mélange à l'aide d'un agitateur, pour que la répartition du sang dans la gélose soit homogène.

NB : Cette préparation est faite dans des conditions stériles (bécher et baron stériles, et ce mélange est réalisé dans une zone stérile).

Annexe 03 : Coloration de Gram

Technique

- La première étape consiste en la préparation du frottis, qui se fait comme suit :
 - Sur une lame propre déposer une goutte d'eau distillée ;
 - Prélever à partir d'une culture pure (enrichissement sur DCLS pure) quelques colonies ;
 - Bien les délayer dans la goutte d'ED et les étaler en faisant en sorte d'obtenir une monocouche homogène;
 - Procéder à un séchage en faisant un geste de vas et viens au-dessus de la flamme ;
 - Une fois séchée, retourner la lame et là faire passer 3 à 4 fois dans la flamme par un geste rapide pour bien fixer les cellules bactériennes ;

- La deuxième étape consiste en la réalisation de la coloration elle-même, elle est réalisée comme suit :
 - Appliquer le premier colorant qui est le violet de gentiane, laisser agir 1min et rejeter ;
 - Ajouter lugol, laisser agir pendant 45 secondes puis rejeter l'excès (sans rincer avec l'eau).
 - Rajouter une deuxième fois le lugol ; laisser agir 45 secondes et rejeter l'excès ;
 - Mettre l'alcool goutte-à-goutte et laisser agir exactement pendant 30 secondes ;
 - Rincer abondamment pour enlever toute trace d'alcool ;
 - Appliquer le deuxième colorant : quelques gouttes de fuschine et laisser agir 1min puis rincer et sécher.

Lecture

Une observation microscopique à l'immersion (Gx1000) est réalisée, afin de déterminer le type de Gram des bactéries étudiées : si ces dernières apparaissent roses elles sont dites : Gram-, par contre si elles sont colorées en violet se sont des Gram+.

Annexe 04 : tableaux

Tableau V : la clef d'identification des entérobactéries de LE MINOR et VIRON (1982).

	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> <i>Arizonae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Shigella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>				<i>Providencia</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Levinea</i>
										<i>vulgaris</i>	<i>mirabilis</i>	<i>morganii</i>	<i>rettegeri</i>			
Mobilité	+	+	+	-	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz en glucose	+	+	+	-	+	+	+	d	d	+	+	+	d	d	+	+
Lactose	-	+ou x	+ou x	-	+	+	+/x	d	-oux	-	-	-	-	-	-	+
ONPG	-	+	+	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
H ₂ S	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Uréase	-	-	-(+)	-	-	(+)	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Indole	-	-	-	d	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
LDC	+	+	-	-	d	+	d	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Citrate	+	+	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	+	+	-	+
Gelatinase	-	(+)	-	-	-	-	d	+	+	+	+	-	-	-	-	d
KCN	-	-	+	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	d
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d	-	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	d
Saccharose	-	-	d	-	d	+	+	d	+	-	x	d	d	d	-	d
Salicine	-	-	d	-	d	+	+	-	+	-	d	-	d	-	-	(+)
Inositol	d	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-
Dulcitol	+	-	d	d	d	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d
RM	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	d	-	-	-	-	-
Malonate	-	+	-	-	-	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-
TTR	+	+	+	-	-	-	-	-	d	+	+	-	-	-	-	d
ADH	+	+	-	d	d	-	d	-	-(+)	-	-	-	-	-	-	-
ODC	d	+	-	d	d	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Mucate	+	d	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	+

+ : Positif en 1^{er} ou 2^{eme} jours ; - : négatif ; x : tardivement et irrégulièrement positif ; (+) : positif tardivement ; d : différents types biochimiques ; -(+) : - en général, exceptionnellement positif tardivement ; LDC : lysine décarboxylase ; ADH : arginine dihydrolase ; TDA : tryptophane désaminase.

Tableau VI : Résultats des tests biochimiques et quelques détails concernant les souches étudiées.

N *	Code référence	La provenance	Prélèvements		Tests biochimiques discriminants				
			Région	Type	Uréase	TDA	Indole	Nitrate réductase	Citratase
01	939 Bt ₅	PFP	Béjaia	Og	-	-	+	+	-
02	760 Bt ₂	30 PR	Bordj bouarreridj	Og	-	-	+	+	-
03	760 Bt ₃	30 PR	Bordj bouarreridj	Og	-	-	+	+	-
04	1090	PR	Bouira	Og	-	-	+	+	-
05	NAFAA 02	PP	/	Og	-	-	+	+	-
06	800 Bt ₁	PFP	Bouira (Ain Bessem)	Og	-	-	+	+	-
07	747	PFP	TiziOuzou	Og	-	-	+	+	-
08	746	PP	Bouira	Og	-	-	+	+	-
09	736 / intérieur	2 échantillons	/	Og	-	-	+	+	-
10	748	PFP	TiziOuzou	Og	-	-	+	+	-

N * : le numéro définitif des souches testées.

Tableau VI (suite) :Résultats des tests biochimiques et quelques détails concernant les souches étudiées.

N *	Code référence	La provenance	Prélèvements		Tests biochimiques discriminants				
			Région	Type	Uréase	TDA	Indole	Nitrate réductase	Citratase
11	946 (1) expertise intestin	PFP	Bouira (Ain Bessem)	MF	-	-	+	+	-
12	946 (2) PEP expertise	PFP	Bouira (Ain Bessem)	Og	-	-	+	+	-
13	Poulet congelé	PC	/	Og	-	-	+	+	-
14	1049 BT ₁	10 tubes de matière fécale + 6 sujets	/	MF et Og	-	-	+	+	-
15	1065	7 PR	EAC n°10 Graria	Og	-	-	+	+	-
16	799 BT ₁	PFP	Bouira	Og	-	-	+	+	-
17	799 BT ₂	PFP	Bouira	Og	-	-	+	+	-
18	799 BT ₃	PFP	Bouira	Og	-	-	+	+	-
19	878 BT ₆	PFP	Bordj bouarreridj (Ain Taghrout)	Og	-	-	+	+	-
20	1062 E ₂	Ps P	Bordj Bou	Og	-	-	+	+	-

N * : le numéro définitif des souches testées.

Tableau VI (suite) :Résultats des tests biochimiques et quelques détails concernant les souches étudiées.

N *	Code référence	La provenance	Prélèvements		Tests biochimiques discriminants				
			Région	Type	Uréase	TDA	Indole	Nitrate réductase	Citratase
21	1062 E ₃	Ps P	Bordj Bou Arreridj	Og	-	-	+	+	-
22	1062 E ₅	Ps P	Bordj Bou Arreridj	Og	-	-	+	+	-
23	1049	6 sujets	/	Og	-	-	+	+	-
24	1049 /0g intestin	matière fécale	/	MF et Og	-	-	+	+	-
25	1050 /0g intestin	matière fécale	/	MF et Og	-	-	+	+	-
26	659 Bt ₂	Ps P	Béjaia (Akbou)	Og	-	-	+	+	-
27	659 Bt ₃	Ps P	Béjaia (Akbou)	Og	-	-	+	+	-
28	660 Bt ₄	PPF	Bouira (Ain Bessem)	Og	-	-	+	+	-
29	NAFAA 01	PP	Boumerdés	Og	-	-	+	+	-
30	1108 Exp	Sujet + fiente	Bouira (Ain Bessem)	MF et Og	-	-	+	+	-

N * : le numéro définitif des souches testées.

Tableau VI (suite) : Résultats des tests biochimiques et quelques détails concernant les souches étudiées.

N *	Code référence	La provenance	Prélèvements		Tests biochimiques discriminants				
			Région	Type	Uréase	TDA	Indole	Nitrate réductase	Citratase
31	1109	PFP	/	Og	-	-	+	+	-
32	1139 Bt ₁	5 PC	Bordj Bou Arreridj	Og	-	-	+	+	-
33	1140 Bt ₂	5 PC	Bordj Bou Arreridj	Og	-	-	+	+	-
34	Bt3/1274	20 poulettes.	Akbou.	Og	-	-	+	+	-
35	1158 Bt ₂	PRP	Bordj bouarreridj (Ain Taghrout)	Og	-	-	+	+	-
36	1158 Bt ₃	PRP	Bordj bouarreridj (Ain Taghrout)	Og	-	-	+	+	-
37	Bt2/ 1391	20 poulettes	Akbou.	Og	-	-	+	+	-
38	1251 Bt ₂	PC	/	Og	-	-	+	+	-
39	470	1 échantillon	/	Og	-	-	+	+	-
N * : le numéro définitif des souches testées.									-

Tableau VI (suite) : Résultats des tests biochimiques et quelques détails concernant les souches étudiées.

N *	Code référence	La provenance	Prélèvements		Tests biochimiques discriminants				
			Région	Type	Uréase	TDA	Indole	Nitrate réductase	Citratase
41	1115	8 PC	Tiziouzou	Og	-	-	+	+	-
42	1062 /E ₈	70 PP	Bordj bouarreridj (Ain	Og	-	-	+	+	-
43	800 Bt ₃ / MF	PFP	Bouira (Ain Bessem)	Og	-	-	+	+	-
44	669 Extérieur	2 échantillons	/	Og	-	-	+	+	-
45	949 E ₆	60 Poussins	Bordj bouarreridj (Ain Taghrout)	Og	-	-	+	+	-
46	949 E ₈	60 Poussins	Bordj bouarreridj	Og	-	-	+	+	-
47	910	5 PFP	TiziOuzou	Og	-	-	+	+	-
48	911	5 PP	Msila	Og	-	-	+	+	-
49	774 / 3	PFP	/	Og	-	-	+	+	-
50	Rt ₁ /1274	40 PR	Bouira	Og	-	-	+	+	-

N * : le numéro définitif des souches testées.

Tableau VII :Le profil de l'antibiorésistance des souches testées.

Souches*	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ETP	ATM	CZ	KF	CTX	CAZ	FEP	CIP	PEF	OFX	PA	NA	GEN	TOB	AK	K	TE	SXT	Cs
	≥19 S <19 R	≥14 S <14 R	≥19 S <19 R	≥23 S <23 R	≥22 S <16 R	≥25 S <22 R	≥26 S <21 R	≥18 S <12 R	≥18 S <12 R	≥20 S <17 R	≥22 S <19 R	≥27 S <21 R	≥26 S <24 R	≥24 S <24 R	≥24 S <22 R	≥19 S <14 R	≥19 S <14 R	≥17 S <14 R	≥17 S <14 R	≥16 S <13 R	≥17 S <15 R	≥19 S <17 R	≥14 S <11 R	≥15 S <15 R
E 25 922	00 R	00 R	S	31 S	S	33 S	S	14 I	12 I	17 I	S	-	S	S	S	S	S	32 S	30 S	25 S	27 S	22 S	S	19 S
E 01	S	S	22 S	00 R	32 S	28 S	S	24 S	14 I	34 S	34 S	26 I	06 R	18 R	12 R	00 R	00 R	26 S	S	24 S	22 S	10 R	27 S	S
E 02	S	16 S	24 S	26 S	S	S	S	20 S	15 I	S	38 S	S	S	24 S	22 I	11 R	00 R	27 S	30 S	40 S	06 R	07 R	06 R	S
E 03	S	S	S	00 R	32 S	28 S	32 S	20 S	16 I	S	S	28 S	32 S	S	26 S	14 I	00 R	32 S	30 S	28 S	22 S	10 R	00 R	18 S
E 04	18 R	S	S	S	S	S	S	27 S	26 S	S	S	S	S	38 S	25 S	20 S	12 R	24 S	30 S	S	24 S	09 R	09 R	19 S
E 05	00 R	00 R	20 S	00 R	40 S	30 S	32 S	26 S	17 I	28 S	30 S	30 S	15 R	17 R	19 R	00 R	00 R	26 S	32 S	25 S	30 S	06 R	26 S	16 S
E 06	00 R	00 R	24 S	06 R	30 S	35 S	S	26 S	19 S	32 S	35 S	30 S	S	S	S	28 S	24 S	S	32 S	30 S	26 S	11 R	S	38 S
E 07	16 R	S	S	S	S	36 S	S	20 S	14 I	S	40 S	34 S	18 R	22 R	18 R	09 R	00 R	26 S	28 S	21 S	21 S	00 R	30 S	S
E 08	00 R	00 R	24 S	15 R	32 S	36 S	42 S	22 S	S	32 S	S	33 S	38 S	30 S	30 S	25 S	21 S	38 S	28 S	28 S	08 R	00 R	18 S	S

Souche *: numéro de collection ; **0** : aucune zone d'inhibition ; le diamètre du disque d'antibiotique étant de 5mm ; - : non déterminer

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IPM : Imipénème ;ETP : Ertapénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; KF :Céfalothine ; CTX : Cefotaxime ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Cefepime; CIP : Ciprofloxacine ; PEF :Péfloxacine ; OFX : Ofloxacine ; PA : Acide pipémidique ; NA : Acide nalidixique ; GEN : Gentamicine ;TOB :Tobramycine ; AK :Amikacine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; SXT : Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; Cs : colistine.

Tableau VII (suite) : Profil de l'antibiorésistance des souches testées.

Souches*	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ETP	ATM	CZ	KF	CTX	CAZ	FEP	CIP	PEF	OFX	PA	NA	GEN	TOB	AK	K	TE	SXT	Cs
	≥19 S <19 R	≥14 S <14 R	≥19 S <19 R	≥23 S <23 R	≥22 S <16 R	≥25 S <22 R	≥26 S <21 R	≥18 S <12 R	≥18 S <12 R	≥20 S <17 R	≥22 S <19 R	≥27 S <21 R	≥26 S <24 R	≥24 S <24 R	≥24 S <22 R	≥19 S <14 R	≥19 S <14 R	≥17 S <14 R	≥17 S <14 R	≥16 S <13 R	≥17 S <15 R	≥19 S <17 R	≥14 S <11 R	≥15 S <15 R
E09	08 R	06 R	24 S	00R	31 S	23 I	38 S	28 S	18 S	41 S	34 S	30 S	S	S	S	28 S	26 S	S	30 S	22 S	30 S	20 S	S	24 S
E10	00 R	00 R	22 S	12 R	30 S	28 S	34 S	23 S	15 I	44 S	36 S	28 S	18 R	12 R	10 R	00 R	00 R	27 S	S	30 S	12 R	10 R	00 R	20 S
E11	09 R	00 R	26 S	S	30 S	30 S	40 S	26 S	18 S	45 S	S	30 S	S	S	00 R	16 I	14 I	40 S	30 S	S	S	38 S	S	20 S
E12	10 R	00R	18 R	00R	30 S	32 S	32 S	14 I	13 I	36 S	S	36 S	S	S	S	S	09 R	28 S	27 S	30 S	00R	16 R	S	18 S
E13	00 R	S	28 S	34 S	28 S	34 S	S	S	20 S	46 S	S	S	S	S	S	S	S	34 S	38 S	40 S	00 R	00 R	S	18 S
E14	09 R	11 R	16 R	08 R	30 S	34 S	33 S	21 S	16 I	31 S	32 S	27 S	30 S	25 S	26 S	15 I	00 R	30 S	24 S	26 S	24 S	08 R	00 R	21 S
E15	00 R	00 R	12 R	00 R	34 S	30 S	40 S	24 S	09 R	38 S	34 S	29 S	00R	00R	08 R	00R	00R	24 S	22 S	30 S	20 S	10 R	09 R	20 S
E16	S	00 R	18 R	00R	36 S	30 S	S	22 I	15 I	45 S	32 S	28 S	10 R	08 R	00R	00R	12 R	29 S	27 S	36 S	00R	00R	00R	17 S
E17	00R	00R	20 S	00R	40 S	30 S	34 S	21 S	14 I	38 S	36 S	30 S	10 R	09 R	00R	00R	00R	16 I	30 S	22 S	00 R	00R	30 S	22 S

Souche *: numéro de collection ; 0 : aucune zone d'inhibition ; le diamètre du disque d'antibiotique étant de 5mm.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IPM : Imipénème ;ETP : Ertapénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; KF :Céfalothine ; CTX : Cefotaxime ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Cefepime ; CIP : Ciprofloxacine ; PEF :Péfloxaciné ; OFX : Ofloxacine ; PA : Acide pipémidique ; NA : Acide nalidixique ; GEN : Gentamicine ;TOB :Tobramycine ; AK :Amikacine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; Cs : colistine.

Tableau VII (suite) : Profil de l'antibiorésistance de souches testées.

Souches*	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ETP	ATM	CZ	KF	CTX	CAZ	FEP	CIP	PEF	OFX	PA	NA	GEN	TOB	AK	K	TE	SXT	Cs
	≥19 S <19 R	≥14 S <14 R	≥19 S <19 R	≥23 S <23 R	≥22 S <16 R	≥25 S <22 R	≥26 S <21 R	≥18 S <12 R	≥18 S <12 R	≥20 S <17 R	≥22 S <19 R	≥27 S <21 R	≥26 S <24 R	≥24 S <24 R	≥24 S <22 R	≥19 S <14 R	≥19 S <14 R	≥17 S <14 R	≥17 S <14 R	≥16 S <13 R	≥17 S <15 R	≥19 S <17 R	≥14 S <11 R	≥15 S <15 R
E18	13 R	00 R	24 S	00 R	32 S	32 S	00 R	18 S	13 I	38 S	36 S	30 S	00 R	20 R	22 R	11 R	11 R	00 R	30 S	S	28 S	38 S	30 S	30 S
E19	09 R	00 R	S	28 S	31 S	30 S	34 S	00 R	18 S	30 S	30 S	30 S	18 R	21 R	00 R	08 R	00 R	38 S	26 S	24 S	00 R	09 R	00 R	30 S
E20	08 R	09 R	15 R	S	22 S	30 S	30 S	20 S	07 R	38 S	34 S	28 S	28 S	28 S	26 S	18 I	15 I	S	26 S	S	26 S	08 R	00 R	10 R
E21	S	26 S	30 S	23 S	S	30 S	S	S	00 R	38 S	36 S	S	46 S	25 S	S	28 S	24 S	20 S	22 S	30 S	23 S	24 S	S	25 S
E22	00 R	00 R	15 R	00 R	28 S	32 S	34 S	24 S	12 I	S	34 S	30 S	34 S	30 S	20 I	16 I	09 R	25 S	26 S	25 S	23 S	09 R	30 S	20 S
E23	00R	00R	12R	00R	30 S	30 S	35 S	00R	16 I	30 S	32 S	12 R	12R	00R	08R	00R	09R	S	28 S	31 S	00R	10 R	00R	16 S
E24	S	S	S	20 R	S	34 S	S	S	12 I	S	S	35 S	S	S	00 R	00 R	S	10 R	20 S	26 S	14 R	13 R	S	20 S
E25	00 R	00 R	00 R	09 R	24 S	26 S	00 R	00 R	00R	10 R	17 R	10 R	17 R	00 R	00 R	00 R	00 R	28 S	23 S	23 S	00 R	00 R	00 R	S
E26	S	16 S	26 S	22 R	S	26 S	34 S	24 S	17 I	30 S	32 S	24 I	30 S	10 R	26 S	13 R	00 R	20 S	25 S	25 S	22 S	11 R	32 S	20 S

Souche *: numéro de collection ; **0** : aucune zone d'inhibition ; le diamètre du disque d'antibiotique étant de 5mm.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IPM : Imipénème ;ETP : Ertapénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; KF :Céfalothine ; CTX : Cefotaxime ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Cefepime; CIP : Ciprofloxacine ; PEF :Péfloxacin ; OFX : Ofloxacine ; PA : Acide pipémidique ; NA : Acide nalidixique ; GEN : Gentamicine ;TOB :Tobramycine ; AK :Amikacine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; Cs : colistine.

Tableau VII (suite) : Profil de l'antibiorésistance de souches testées.

Souches*	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ETP	ATM	CZ	KF	CTX	CAZ	FEP	CIP	PEF	OFX	PA	NA	GEN	TOB	AK	K	TE	SXT	Cs
	≥19 S <19 R	≥14 S <14 R	≥19 S <19 R	≥23 S <23 R	≥22 S <16 R	≥25 S <22 R	≥26 S <21 R	≥18 S <12 R	≥18 S <12 R	≥20 S <17 R	≥22 S <19 R	≥27 S <21 R	≥26 S <24 R	≥24 S <24 R	≥24 S <22 R	≥19 S <14 R	≥19 S <14 R	≥17 S <14 R	≥17 S <14 R	≥16 S <13 R	≥17 S <15 R	≥19 S <17 R	≥14 S <11 R	≥15 S <15 R
E 27	12 R	S	33 S	36 S	34 S	20 R	36 S	24 S	22 S	S	30 S	S	30 S	30 S	20 R	14 I	13 R	28 S	26 S	30 S	09 R	12 R	09 R	S
E 28	08 R	S	29 S	00 R	32 S	30 S	40 S	30 S	26 S	40 S	37 S	30 S	16 R	12 R	20 R	12 R	00 R	24 S	24 S	38 S	00 R	10 R	10 R	19 S
E 29	00 R	00 R	20 S	00 R	30 S	32 S	34 S	18 S	10 R	S	32 S	32 S	20 R	12 R	10 R	00 R	00 R	34 S	27 S	25 S	23 S	00 R	32 S	18 S
E 30	20 S	00 R	24 S	00 R	30 S	S	40 S	36 S	08 R	32 S	31 S	S	00 R	00 R	00 R	12 R	00 R	28 S	23 S	25 S	23 S	16 R	14 S	17 S
E 31	14 R	00 R	15 R	00 R	30 S	36 S	30 S	16 I	13 I	32 S	38 S	35 S	15 R	20 R	16 R	00 R	00 R	32 S	30 S	23 S	00 R	12 R	00 R	20 S
E 32	00 R	12 R	28 S	28 S	26 S	34 S	S	30 S	13 I	34 S	30 S	32 S	23 R	21 R	15 R	22 S	00 R	50 S	32 S	22 S	24 S	08 R	31 S	18 S
E 33	00 R	00 R	15 R	00 R	20 I	34 S	36 S	22 S	17 I	28 S	36 S	33 S	24 I	24 S	20 R	00 R	00 R	30 S	30 S	30 S	26 S	00 R	00 R	20 S
E 34	00 R	00 R	00 R	00 R	30 S	34 S	37 S	16 I	12 I	40 S	30 S	-	S	24 S	31 S	29 S	24 S	27 S	25 S	21 S	S	24 S	34 S	22 S
E 35	10 R	14 S	26 S	39 S	30 S	S	S	22 S	S	32 S	36 S	S	13 R	11 R	10 R	00 R	00 R	24 S	24 S	22 S	18 S	24 S	40 S	S

Souche *: numéro de collection ; 0 : aucune zone d'inhibition ; le diamètre du disque d'antibiotique étant de 5mm ; - : non déterminer.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IPM : Imipénème ; ETP : Ertapénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; KF : Céfalothine ; CTX : Cefotaxime ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Cefepime ; CIP : Ciprofloxacine ; PEF : Péfloxacin ; OFX : Ofloxacine ; PA : Acide pipémidique ; NA : Acide nalidixique ; GEN : Gentamicine ; TOB : Tobramycine ; AK : Amikacine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; Cs : colistine.

Tableau VII (suite) : Profil de l'antibiorésistance des souches testées.

Souches*	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ETP	ATM	CZ	KF	CTX	CAZ	FEP	CIP	PEF	OFX	PA	NA	GEN	TOB	AK	K	TE	SXT	Cs
	≥19 S <19 R	≥14 S <14 R	≥19 S <19 R	≥23 S <23 R	≥22 S <16 R	≥25 S <22 R	≥26 S <21 R	≥18 S <12 R	≥18 S <12 R	≥20 S <17 R	≥22 S <19 R	≥27 S <21 R	≥26 S <24 R	≥24 S <24 R	≥24 S <22 R	≥19 S <14 R	≥19 S <14 R	≥17 S <14 R	≥17 S <14 R	≥16 S <13 R	≥17 S <15 R	≥19 S <17 R	≥14 S <11 R	≥15 S <15 R
E 36	00 R	20 S	21 S	30 S	38 S	S	38 S	26 S	11 R	40 S	30 S	S	S	20 R	22 S	11 R	08 R	28 S	22 S	26 S	22 S	16 R	36 S	42 S
E 37	06 R	17 S	07 R	22 R	S	32 S	S	12 I	11 R	38 S	33 S	-	43 S	24 S	36 S	33 S	25 S	29 S	30 S	24 S	27 S	11 R	S	19 S
E 38	17 R	00 R	16 R	00 R	28 S	31 S	44 S	26 S	07 R	38 S	34 S	32 S	12 R	12 R	11 R	08 R	00 R	13 R	20 S	22 S	00 R	00 R	00 R	22 S
E 39	08 R	00 R	00 R	13 R	30 S	36 S	16 R	20 S	15 I	22 S	34 S	34 S	08 R	00 R	00 R	12 R	00 R	35 S	23 S	23 S	08 R	08 R	00 R	15 S
E 40	07 R	06 R	12 R	00 R	25 S	32 S	40 S	20 S	14 I	54 S	31 S	S	08 R	00 R	00 R	00 R	00 R	25 S	26 S	21 S	00 R	00 R	00 R	11 R
E 41	06 R	06 R	20 S	07 R	25 S	37 S	40 S	22 S	15 I	33 S	30 S	33 S	12 R	11 R	11 R	11 R	00 R	28 S	28 S	23 S	24 S	09 R	00 R	17 S
E 42	09 R	24 S	09 R	26 S	28 S	32 S	38 S	34 S	15 I	52 S	36 S	35 S	28 S	22 R	20 R	10 R	06 R	30 S	38 S	26 S	26 S	08 R	34 S	40 S
E 43	11 R	22 S	15 R	32 S	20 I	S	S	40 S	25 S	35 S	40 S	34 S	21 R	18 R	11 R	00 R	00 R	30 S	29 S	20 S	23 S	00 R	40 S	00 R

Souche *: numéro de collection ; **0** : aucune zone d'inhibition ; le diamètre du disque d'antibiotique étant de 5mm ; - : non déterminer.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IPM : Imipénème ; ETP : Ertapénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; KF : Céfalothine ; CTX : Cefotaxime ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Cefepime ; CIP : Ciprofloxacine ; PEF : Péfloxacin ; OFX : Ofloxacine ; PA : Acide pipémidique ; NA : Acide nalidixique ; GEN : Gentamicine ; TOB : Tobramycine ; AK : Amikacine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; SXT : Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; Cs : colistine.

Tableau VII (suite) : Profils de l'antibiorésistance des souches testées.

Souches*	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ETP	ATM	CZ	KF	CTX	CAZ	FEP	CIP	PEF	OFX	PA	NA	GEN	TOB	AK	K	TE	SXT	Cs
	≥19 S <19 R	≥14 S <14 R	≥19 S <19 R	≥23 S <23 R	≥22 S <16 R	≥25 S <22 R	≥26 S <21 R	≥18 S <12 R	≥18 S <12 R	≥20 S <17 R	≥22 S <19 R	≥27 S <21 R	≥26 S <24 R	≥24 S <24 R	≥24 S <22 R	≥19 S <14 R	≥19 S <14 R	≥17 S <14 R	≥17 S <14 R	≥16 S <13 R	≥17 S <15 R	≥19 S <17 R	≥14 S <11 R	≥15 S <15 R
E44	32 S	00 R	00 R	32 S	20 I	36 S	S	40 S	13 I	30 S	40 S	29 S	15 R	11 R	07 R	00 R	06 R	26 S	28 S	21 S	00 R	09 R	35 S	17 S
E45	10 R	00 R	20 S	44 S	00 R	31 S	40 S	14 I	22 S	38 S	40 S	28 S	20 R	17 R	12 R	00 R	07 R	42 S	36 S	26 S	26 S	00 R	35 S	20 S
E46	11 R	00 R	00 R	07 R	S	32 S	41 S	22 S	17 I	44 S	36 S	27 S	13 R	12 R	11 R	00 R	12 R	11 R	19 S	22 S	19 S	12 R	00 R	22 S
E47	06 R	16 S	06 R	20 R	26 S	32 S	36 S	18 S	11 R	S	30 S	-	14 R	09 R	00 R	00 R	00 R	28 S	24 S	S	S	10 R	07 R	22 S
E48	09 R	16 S	00 R	20 R	32 S	34 S	32 S	22 S	11 R	30 S	30 S	-	26 S	22 R	18 R	00 R	14 I	23 S	27 S	28 S	24 S	10 R	00 R	00 R
E49	10 R	00 R	00 R	12 R	S	36 S	S	11 R	09 R	24 S	50 S	-	07 R	08 R	12 R	14 I	09 R	31 S	25 S	23 S	09 R	00 R	07 R	17 S
E50	S	00 R	00 R	28 S	S	S	S	28 S	00 R	S	40 S	-	40 S	26 S	44 S	36 S	14 I	30 S	28 S	21 S	25 S	24 S	40 S	18 S

Souche *: numéro de collection ; **0** : aucune zone d'inhibition ; le diamètre du disque d'antibiotique étant de 5mm ; - : non déterminer.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IPM : Imipénème ;ETP : Ertapénème ; ATM : Aztreonam; CZ : Céfazoline ; KF :Céfalothine ; CTX : Cefotaxime ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Cefepime; CIP : Ciprofloxacine ; PEF :Péfloxacine ; OFX : Ofloxacine ; PA : Acide pipémidique ; NA : Acide nalidixique ; GEN : Gentamicine ;TOB :Tobramycine ; AK :Amikacine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; SXT : Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; Cs : colistine.

Tableau VIII : Résultats des tests de virulence effectuée sur les souches étudiées.

Souches	Tests de virulence.		
	La résistance au sérum humain.	La fixation du Rouge Congo.	Hémolysine.
E 01	R.	+	β
E 02	R.	+	β
E 03	R.	-	β
E 04	R.	-	α
E 05	R.	-	α
E 06	R.	-	β
E 07	R.	-	β
E 08	R.	-	α
E 09	R.	-	α
E 10	R.	-	α
E 11	R.	-	α
E 12	R.	+	β
E 13	R.	-	α
E 14	R.	+	β
E 15	R.	+	β
E 16	R.	-	α
E 17	R.	-	α
E 18	R.	-	α
E 19	R.	+	α
E 20	R.	+	α
E 21	S.	+	β
E 22	R.	+	α
E 23	R.	-	β
E 24	R.	-	α
E 25	R.	-	β

R : Résistance au sérum.
S : Sensibilité au sérum.

+: fixation du rouge Congo.
- : pas de fixation du colorant.

α : hémolysine incomplète.
 β : hémolysine complète.

Tableau VIII (suite) : Résultats des tests de virulence effectuée sur les souches

Souches	Tests de virulence.		
	La résistance au sérum humain.	La fixation du Rouge Congo.	Hémolysine.
E 26	R.	-	β
E 27	R.	-	β
E 28	R.	-	β
E 29	R.	-	β
E 30	S.	+	β
E 31	R.	+	β
E 32	R.	-	β
E 33	R.	-	β
E 34	R.	+	β
E 35	R.	+	β
E 36	R.	+	β
E 37	R.	+	α
E 38	R.	-	β
E 39	R.	-	β
E 40	R.	-	β
E 41	R.	+	β
E 42	R.	-	β
E 43	R.	+	β
E 44	R.	-	β
E 45	R.	+	β
E 46	R.	+	β
E 47	R.	+	β
E 48	R.	-	β
E 49	R.	-	β
E 50	R.	+	α

R : Résistance au sérum.

+ : fixation du rouge Congo.

 α : hémolysine incomplète.

S : Sensibilité au sérum.

- : pas de fixation du colorant.

 β : hémolysine complète.

Annexe 05 : Structures chimiques

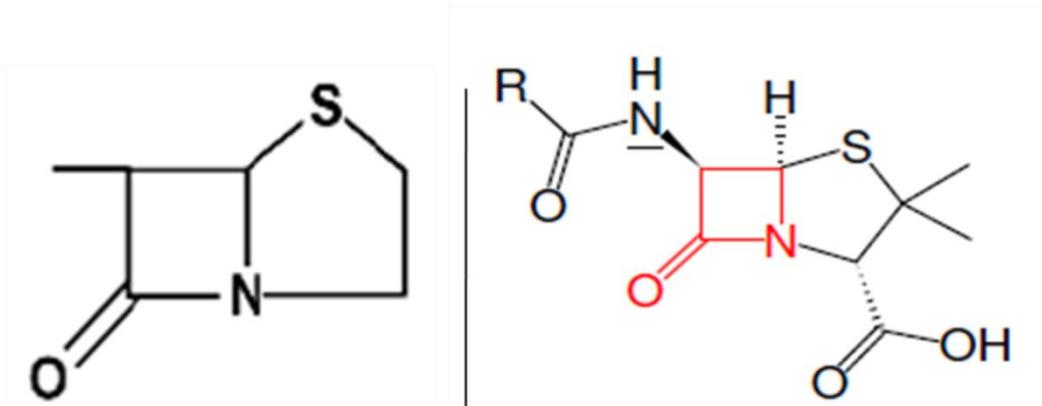


Figure 30: Structure de base des pénames (à gauche), structure de la pénicilline (à droite) (BEN YOUSSEF *et al.*, 2016).

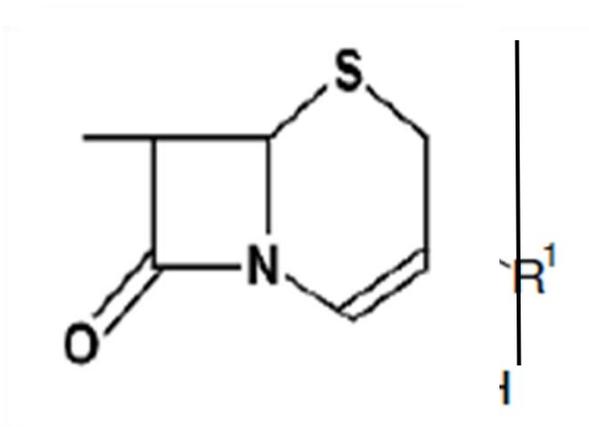
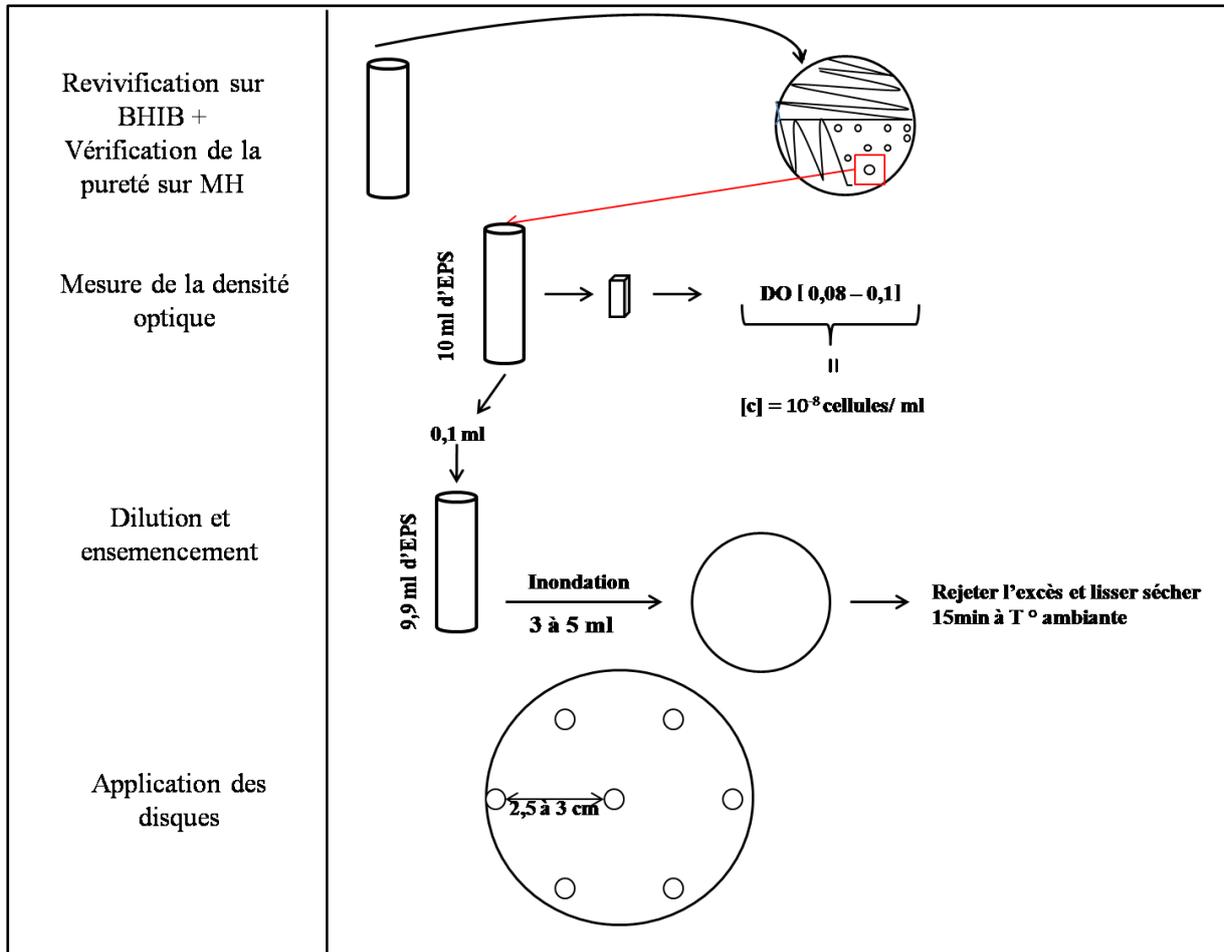


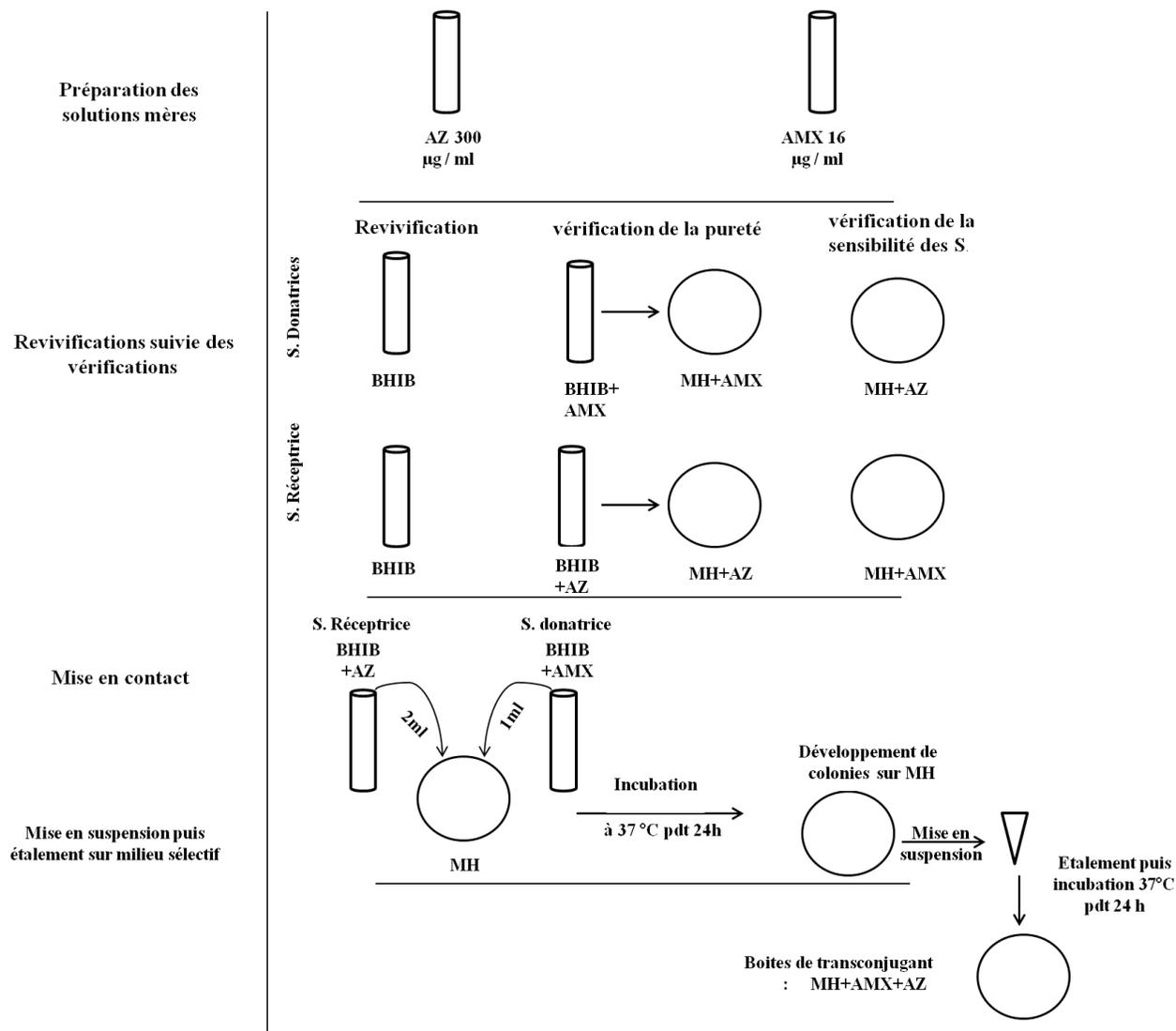
Figure 31 : Structure de base des céphèmes (à gauche), structure d'une céphalosporine(à droite) (BEN YOUSSEF *et al.*, 2016).

Annexe 06 : Schémas



BHIB :BrainHeartInfusionBroth ; MH :Mueller Hinton ;EPS : Eau physiologique stérile ;
DO : Densité optique.

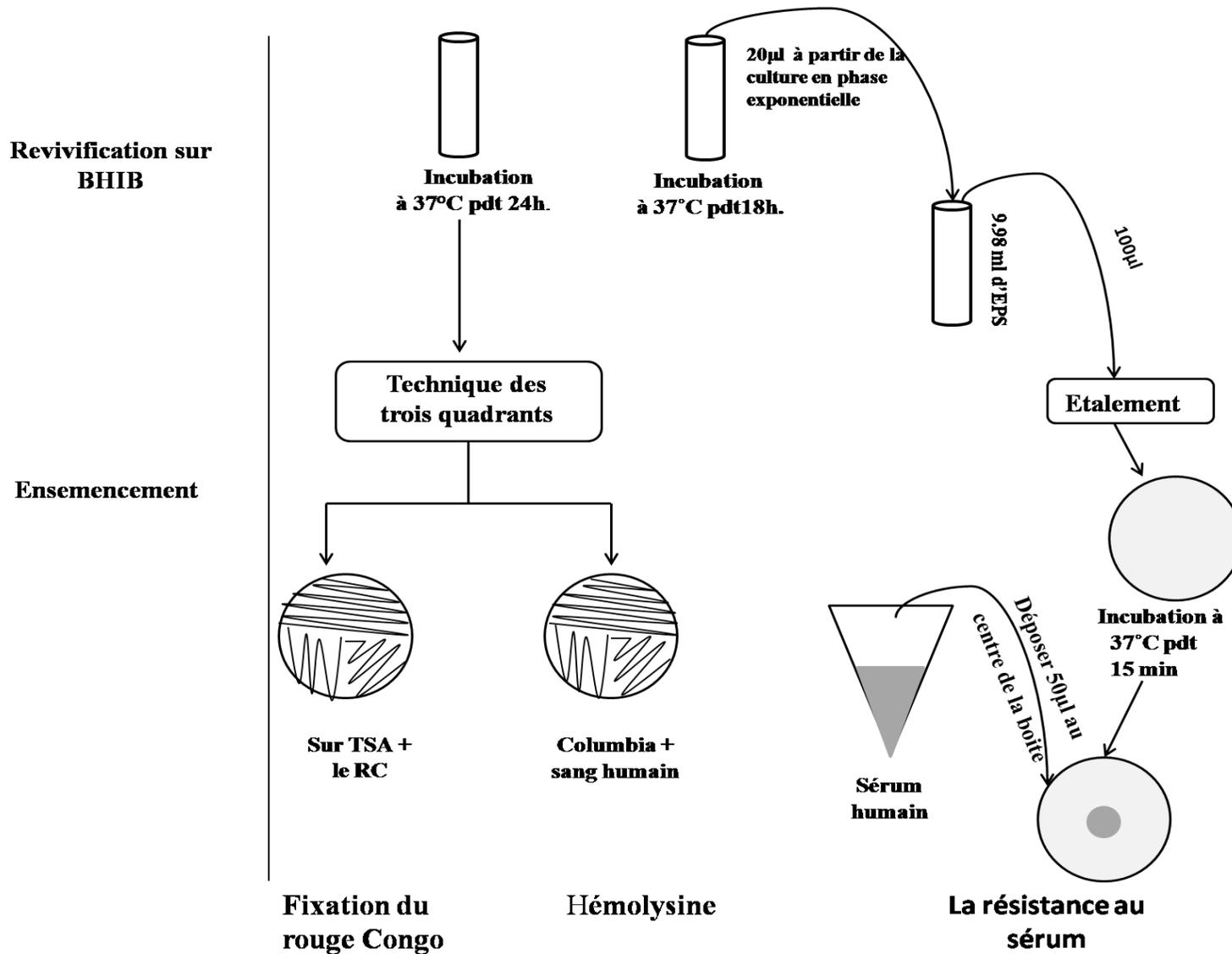
Figure 32 :Schéma récapitulatif de l'antibiogramme.



AZ :Azide de sodium ; AMX : Amoxicilline ; S : souches; BHIB : Brain Heart Infusion Broth ;

MH: Mueller Hinton

Figure 33 :Schéma récapitulatif du transfert des caractères de résistance par conjugaison bactérienne.



BHIB :Brainheart infusion broth ; EPS : Eau physiologique stérile ; TSA :Tryptase-Soja-Agar ;RC : Rouge Congo

Figure 34 :Schéma récapitulatif des tests de recherches des facteurs de virulences.

