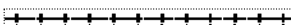


# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



ECOLE INTER - ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE  
VETERINAIRES (E.I.S.M.V.)



ANNEE 2012

N° 3

**Prévalence des gènes de virulence et d'antibiorésistance des  
*Escherichia coli* dans les fermes de poulets de chair de la  
zone péri-urbaine de Dakar (Sénégal)**

**Mémoire de diplôme de Master en Santé Publique Vétérinaire  
Spécialité : Epidémiologie des maladies transmissibles et Gestion  
des Risques Sanitaires**

Présenté et soutenu publiquement le **28 Janvier 2012 à 9 Heures**

Par

**VOUNBA Passoret**

Né le 1<sup>er</sup> janvier 1980 à Gouin/Torroch (TCHAD)

---

---

## JURY

---

---

**Président :**

**M. Louis Joseph PANGUI**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Membres :**

**M. Bhen Sikina TOGUEBAYE**

Professeur à la F.S.T de l'UCAD

**M. Germain Jérôme SAWADOGO**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Directeur de recherches :**

**Mme Rianatou BADA ALAMBEDJI**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

---

**Co-directeurs :**

**M. John Morris FAIRBROTHER**

Professeur à l'Université de Montréal et directeur du EcL

**M. Philippe Soumahoro KONE**

Assistant au service de MIPI (E.I.S.M.V de Dakar)

## **Dédicaces**

A Dieu Le Tout-Puissant pour Son Soutien sans fin,

Je dédie ce travail à :

- mes parents pour leurs inlassables sacrifices;
- mes frères et sœurs pour leur inconditionnel soutien;
- mes amis auprès desquels je trouve toujours de précieux conseils;
- tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Remerciements

### Mes très sincères remerciements :

- A l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) pour avoir financé cette étude;
- A Mme Rianatou BADA ALAMBEDJI, Professeur à l'EISMV de Dakar. Vous avez été pour moi, non seulement un maître mais également une mère. Merci pour la confiance que vous m'aviez faite en me donnant ce sujet de mémoire, pour les précieux conseils scientifiques et maternels que vous ne cessez de m'apporter et pour n'avoir pas hésité à descendre sur le terrain pour prendre contact avec les cliniciens et assister aux prélèvements. Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans votre active participation;
- A Monsieur John Morris FAIRBROTHER, Professeur à la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal et Directeur du laboratoire EcL. Toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli bras ouverts dans votre laboratoire et pour la confiance placée en moi pour réaliser cette étude. Votre simplicité, vos qualités humaines et d'homme de sciences nous ont séduits lors de notre séjour dans votre laboratoire. Grand merci!
- Au Dr Philippe KONE, assistant au service de MIPI pour sa constante disponibilité et ses précieux apports lors des étapes d'échantillonnage et de finalisation de ce document;
- A Clarisse Dessautels, responsable du laboratoire EcL et Brigitte Lehoux, technicienne audit laboratoire. Vous m'aviez reçu au laboratoire comme stagiaire et m'aviez consacré une bonne partie de votre temps en m'aidant et en me guidant tout au long de mon stage. Ce travail est le vôtre et soyez en remerciées;
- A la famille Nadeau pour l'accueil qui m'a été réservé au Canada et pour toute la sympathie manifestée à mon égard;
- A mes compatriotes Georges et Dr Aboulmali qui n'ont eu pour seule préoccupation que de rendre mon séjour au Canada très agréable. Dieu vous rendra tout cela au centuple;

- Aux Drs Ibrahima Wade et Charles Dieng sans lesquels, les travaux de terrain n'auraient pas été possibles;
- Aux stagiaires du laboratoire EcL : Thu, Rashin, Jessie, Flavien, Gabriel et Benoît. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance;
- A Mlle Grace Gaya pour tes précieux et multiples soutiens. Jamais je ne t'oublierai;
- A Mlle Amina pour sa modeste contribution;
- A Monsieur Moussa SENE, technicien au laboratoire de MIPI (EISMV-Dakar) pour sa constante disponibilité et pour les nombreuses connaissances acquises auprès de lui;
- Aux Drs GBATI, KAMGA et LAPO pour leur soutien multiforme;
- A mes amis Gabyi, Daoussa, Ali, Onsou, Alix, Dr Abakar, Dr Adoum, Sobdibé, Djimasdé. Je ne vous oublierai jamais;
- A la famille de Dr Bray et de M. Lévy;
- A Monsieur Clément Mukiza pour le compagnonnage au Canada;
- Au vélo qui m'a été offert par le Pr FAIRBROTHER et qui m'avait permis de connaître les coins et recoins de la ville de Saint-Hyacinthe (Canada);
- Au Directeur de l'EISMV et au coordonateur des masters;
- A tous les professeurs et personnel de l'EISMV;
- A Mme CAILLEAU pour sa contribution dans les analyses statistiques;
- A mes compatriotes qui ont étudié à l'EISMV et ceux (celles) qui y étudient actuellement;
- A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

## **A nos maîtres et juges**

- A notre maître et président du jury, Louis Joseph PANGUI,

Professeur à l'EISMV de Dakar

Vous avez accepté malgré vos multiples occupations de présider notre jury de soutenance. Vos qualités humaines et d'homme de sciences resteront à jamais gravées dans notre mémoire. Veuillez accepter, honorable maître, nos meilleurs vœux pour l'année 2012;

- A notre maître et directeur de mémoire, Rianatou BADA ALAMBEDJI, Professeur à l'EISMV de Dakar

Vous nous avez confié ce travail d'une haute qualité scientifique et vous l'avez dirigé avec dextérité, rigueur et ardeur. Votre constante disponibilité et votre abnégation pour un travail bien fait ont suscité notre admiration. Veuillez accepter cher maître, nos sincères remerciements. Meilleurs vœux pour cette année 2012!

- A notre maître, Germain Jérôme SAWADOGO,

Professeur à l'EISMV de Dakar

Votre présence parmi les membres de notre jury nous honore. Nous gardons de vous, l'image d'un maître très dynamique qui impose respect et admiration. Au-delà de notre profonde gratitude, nous vous prions d'accepter l'expression de notre très haute considération et nos vœux les meilleurs pour l'année 2012.

- A notre maître et juge Bhen Sikina TOGUEBAYE,

Professeur à la faculté des sciences et techniques de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD).

Vous nous faites l'insigne honneur de siéger à notre jury de soutenance. Votre légendaire qualité d'homme de science force respect et admiration. Veuillez croire en notre sincère reconnaissance. Bonne année 2012!

## Liste des abréviations

% : pour cent

°C : degré Celsius

µl : microlitre

*aac (6)* : gène codant pour l'aminoglycoside-acétyltransférase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AEEC : Attaching and Effacing *E. coli* (*E. coli* inducteurs des lésions d'attachement et d'effacement des villosités intestinales)

AFEC : Avian Fecal *E. coli* (*E. coli* fécaux d'origine aviaire)

AFSSA : Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments

Ag : antigène

APEC : Avian Pathogenic *E. coli* (*E. coli* pathogènes d'origine aviaire)

*bla<sub>CMY-2</sub>* : gène codant pour la β-lactamase-cephamycinase-2

*bla<sub>CTX-M15</sub>* : gène codant pour la β-lactamase-cefotaximase M<sub>15</sub>

*bla<sub>OXA</sub>* : gène codant pour la β-lactamase-oxacillinase

*bla<sub>SHV</sub>* : gène codant pour la β-lactamase Sulfi-Hydroxyl Variable

*bla<sub>TEM</sub>* : gène codant pour la β-lactamase Temoniera

Cl<sup>-</sup> : ion chlorure

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute (Institut de Standardisation en Clinique et en Laboratoire)

CNF : Cell Necrotising Factor (Facteur Nécrosant des Cellules)

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

*eae* : gène codant pour l'intimine, l'adhésine associée aux lésions d'attachement et d'effacement des *E. coli*

EcL : *Escherichia coli* Laboratory (Laboratoire de l'OIE pour *E. coli*)

*ehx* : gène codant pour l'entéro-hémolysine

ETEC : Enterotoxigenic *E. coli* (*E. coli* entérotoxinogènes)

ExPEC : Extraintestinal pathogenic *E. coli* (*E. coli* pathogènes extra-intestinaux)

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

for : forward (brin principal d'ADN)

g : gramme

h : heure

*iucD* : iron uptake chelate gene (gène codant pour la chélation du fer)

kg : kilogramme

LB : milieu de Luria Bertani

LT : entérotoxine thermolabile

mg : milligramme

MgCl<sub>2</sub> : chlorure de magnésium

ml : millilitre

mn : minute

mTSB : bouillon de soja tryptique (TSB) modifié par ajout de sels biliaires

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PICRA : programme intégré canadien de surveillance de l'antibiorésistance

*qnr* : gène codant pour la résistance aux quinolones

rev : reverse (brin d'ADN anti-sens)

s : seconde

SHU : syndrome hémolytique et urémique

ST : entérotoxine thermostable

STEC : Shigatoxin Producing *E. coli* (*E. coli* producteurs de toxines shiga)

Taq : *Thermus aquaticus*, bactérie de laquelle l'ADN polymérase est isolée

Tsh : Temperature sensitive hemagglutinin (hémagglutinine thermosensible)

UPEC : Uropathogenic *E. coli* (*E. coli* uropathogènes)

*stx1* (*stx2*) : gène codant pour la production des shiga-toxines 1 ou 2.

V : volt.

## Liste des tableaux

Tableau I : Facteurs et gènes de virulence des autres pathotypes d' <i>E. coli</i> .....	5
Tableau II : Fréquences (%) d'antibiorésistance des isolats d' <i>E. coli</i> aviaires dans quelques pays. ....	9
Tableau III: Gènes de résistance des <i>E. coli</i> aviaires à quelques antibiotiques ..	10
Tableau IV : Liste des gènes de virulence testés, des amorces et des souches de contrôle positives utilisées dans les PCR. ....	16
Tableau V : Liste des gènes de résistances aux antibiotiques testés, des amorces et des souches de contrôle positives utilisées dans les PCR. ....	17
Tableau VI: Nombre (pourcentage) d'isolats d' <i>E. coli</i> résistants aux différents antibiotiques selon les types d'échantillons. ....	20
Tableau VII : Prévalences des gènes de résistance aux antibiotiques. ....	1
Tableau VIII : Prévalences des gènes de virulence dans les échantillons testés par PCR multiplexes. ....	22

## Liste des figures

Figure 1: Matériel de PCR, d'électrophorèse et de prise d'image. ....	11
Figure 2 : Approche méthodologique des analyses de laboratoire .....	1
Figure 3 : Profil de migration des gènes des ExPEC sur gel d'agarose. ....	18
Figure 4 : Fréquences des virotypes des ExPEC testés par PCR multiplexe. ....	23



## Table des matières

DÉDICACES.....	I
REMERCIEMENTS .....	II
A NOS MAÎTRES ET JUGES.....	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	V
LISTE DES FIGURES.....	VII
TABLE DES MATIÈRES .....	VIII
RESUME.....	X
ABSTRACT .....	XI
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	2
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES <i>E. COLI</i> .....	2
I.1 CLASSIFICATION.....	2
I.2 SÉROTYPES ET PATHOTYPES DES <i>E. COLI</i> .....	2
1.2.1 Sérotypes des <i>E. coli</i> aviaires .....	2
1.2.2 Pathotypes des <i>E. coli</i> .....	2
1.2.3 Sources animales des différents pathotypes d' <i>E. coli</i> potentiellement zoonotiques.....	3
1.2.4 Facteurs et gènes de virulence associés aux <i>E. coli</i> .....	4
I.3 IMPORTANCE DES <i>E. COLI</i> EN AVICULTURE .....	6
CHAPITRE II. RÉSISTANCE DES <i>E. COLI</i> AUX ANTIBIOTIQUES.....	7
II. 1 SUPPORTS GÉNÉTIQUES DE L'ANTIBIORÉSISTANCE .....	7
II.1.1 Résistance chromosomique .....	7
II.1.2 Résistance extrachromosomique ou plasmidique .....	7
II.2 EPIDÉMILOGIE DE LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX ANTIBIOTIQUES .....	8
II.2.1 Usage des antibiotiques en production animale.....	8
II.2.2 Prévalence de l'antibiorésistance des <i>E. coli</i> .....	8
II.2.3 Gènes de résistance des <i>E. coli</i> aux antibiotiques .....	9
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....	11
CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	11
I.1 MATÉRIEL .....	11
I.1.1 Zone de l'étude .....	11
I.1.2 Matériel d'étude.....	11
I.1.3 Matériel de prélèvement et d'analyse de laboratoire .....	11

I.2 MÉTHODES .....	12
<i>I.2.1 Collecte des données sur le terrain</i> .....	12
<i>I.2.2 Méthodes d'analyse de laboratoire</i> .....	12
<i>I.2.2.1 Isolement des souches d'E. coli</i> .....	13
CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	19
II.1 RÉSULTATS .....	19
<i>II.1.1 Résultats de terrain</i> .....	19
<i>II.1.2 Résultats de laboratoire</i> .....	19
II.2 DISCUSSION .....	23
<i>II.2.1 Discussion de la méthodologie</i> .....	23
<i>II.2.2 Discussion des résultats</i> .....	24
II.3 RECOMMANDATIONS.....	27
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	28
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	29
ANNEXE.....	32

## Résumé

Cette étude pionnière avait pour objectif de caractériser les souches d'*Escherichia coli* isolées des échantillons collectés dans 32 fermes de poulets de chair de la zone périurbaine de Dakar.

Un total de 118 échantillons a ainsi été criblé par PCR multiplexes pour la détermination de la prévalence des gènes de virulence des ExPEC et des STEC. Les résultats ont montré une prévalence significativement élevée des gènes de virulence des ExPEC (*iucD* : 62% ; *tsh* : 50% ; *papC* : 33% et *cnf* : 6,8%) comparativement à la prévalence des gènes de virulence des STEC (*eae* : 3% ; *stx1* : 3,4% et *stx2* : 0%). A partir de ces 118 souches, 173 isolats ont été sélectionnés après des tests biochimiques et soumis au test de sensibilité à 15 antibiotiques, en utilisant la méthode de diffusion en gélose. La résistance a intéressé tous les 15 antibiotiques et les plus hauts niveaux de résistance ont été enregistrés pour la tétracycline (94%), le sulfisoxazole (90%) et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (85%). Parmi ces 173 isolats, 90 ont été testés par PCR multiplexe pour la recherche des virotypes des ExPEC. Ce test a montré une forte prévalence des virotypes impliquant uniquement les gènes *iucD* et/ou *tsh* (*iucD-tsh* (14,44%), *iucD* (7,77%) et *tsh* (7,77%)) par rapport aux autres virotypes (*tsh-papC* (1,11%) et *tsh-cnf* (1,11%)). En fin, 25 isolats choisis parmi les 90 précédents ont été testés par PCR uniplexes pour la détection des gènes de résistance à l'ampicilline (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*), aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)*), au ceftriaxone (*bla<sub>CTX-M15</sub>*) et au ceftiofur (*bla<sub>CMY-2</sub>*). Une forte prévalence a été obtenue pour le gène *bla<sub>TEM</sub>* (72%) avec une association significative à la résistance phénotypique, suivie de la prévalence des gènes *qnrB* (24%) et *bla<sub>SHV</sub>* (12%). Aucun isolat n'était positif aux gènes *bla<sub>OXA</sub>*, *qnrA*, *aac(6)* et *bla<sub>CMY-2</sub>*.

Cette étude préliminaire mérite d'être complétée par une caractérisation phylogénique et génotypique afin de connaître les groupes phylogénétiques d'*Escherichia coli* présents au Sénégal.

**Mots clés** : *Escherichia coli* aviaires, gènes de virulence, gènes de résistance aux antibiotiques, ExPEC, STEC, Dakar.

## Abstract

This pioneer study aimed to characterize *Escherichia coli* strains isolated from samples collected in 32 farms of healthy broiler chickens around Dakar (Senegal).

A total of 118 *E. coli* samples were examined by multiplex PCR to determine the prevalence of ExPEC and STEC pathotypes virulence genes. The results showed a significantly high prevalence of ExPEC virulence genes (*iucD* : 62% ; *tsh* : 50% ; *papC* : 33% and *cnf* : 6,8%) compared to the prevalence of STEC virulence genes (*eae* : 3% ; *stx1* : 3,4% and *stx2* : 0%). From these 118 *E. coli* samples, 173 isolates were selected on the basis of biochemical tests and analysed for their susceptibilities to 15 antimicrobial agents, by using the disk diffusion method. The resistance were observed against all of the antimicrobials and among these antimicrobial agents, tetracycline (94%), sulfisoxazole (90%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (85%) showed a very high level of resistance. Among these 173 isolates, 90 were tested by uniplex PCR for their ExPEC virotypes. This PCR examination has showed a high prevalence of virotypes including *iucD* and/or *tsh* genes (*iucD-tsh* (14,44%), *iucD* (7,77%) and *tsh* (7,77%)) in comparison to the other virotypes (*tsh-papC* (1,11%) and *tsh-cnf* (1,11%)). At last, 25 isolates was selected and examined by uniplex PCR for the presence of resistance genes against ampicillin (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*), quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)*), ceftriaxone (*bla<sub>CTX-M15</sub>*) and ceftiofur (*bla<sub>CMY-2</sub>*). A high prevalence of *bla<sub>TEM</sub>* (72%) with significant association to phenotypical resistance to ampicillin was found, followed by *qnrB* (24%) and *bla<sub>SHV</sub>* (12%). No isolate was positive for *bla<sub>OXA</sub>*, *qnrA*, *aac(6)* or *bla<sub>CMY-2</sub>*.

The study should be continued by characterization of a greater number of samples in a large part of Sénégal. This study could be completed by the *E. coli* phylotyping and genotyping, order to ascertain precisely the phylogenetic groups of *E. coli* in Sénégal.

**Keywords:** Avian *Escherichia coli*, virulence genes, antimicrobial resistance genes, ExPEC, STEC, Dakar.

## Introduction

Pour pallier le déficit en protéines animales, l'Etat du Sénégal a mis l'accent sur l'élevage des animaux à cycle court et plus particulièrement l'aviculture en créant, dès 1962, le Centre National Avicole (C.N.A) de Mbao. Malgré cette initiative, cette filière est encore dominée par le système traditionnel en raison de son extension en milieu rural. Néanmoins, l'aviculture a connu un essor ces dernières années et s'est modernisée surtout en périphérie des grands centres urbains comme Dakar et Thiès. En effet, grâce à l'implantation à Dakar de provenderies et de couvoirs, la filière a enregistré de 1990 à 2000, un taux de croissance annuelle de 9,2% (F.A.O., 2005).

Cependant, cette modernisation s'est faite sans maîtrise des règles d'hygiène, entraînant le développement dans les élevages de diverses pathologies aux conséquences souvent désastreuses pour la volaille, voire pour l'Homme. C'est le cas de la colibacillose aviaire (due à *Escherichia coli*), une infection bactérienne très fréquente en aviculture et qui constitue la première cause de traitement antibiotique chez la volaille (Robineau et Moalic, 2010). De plus, ce germe peut être zoonotique (Kabir, 2010) et l'antibiothérapie anarchique pratiquée en aviculture favorise la sélection des souches multirésistantes.

C'est donc en raison de son impact à la fois hygiénique et économique et du risque d'émergence des résistances aux traitements antibiotiques que nous avons entrepris d'étudier cette bactérie dans les fermes de poulets de chair de Dakar.

L'objectif général de cette étude est de déterminer la prévalence des gènes de virulence et d'antibiorésistance des *E. coli* dans les élevages avicoles de Dakar. De manière spécifique, ce travail consiste à :

- prélever des échantillons de fèces, d'eau d'abreuvement, d'eau de lavage (de déplumage, de rinçage) des carcasses et écouvillonner les carcasses pour en isoler les *E. coli*;
- tester la sensibilité des isolats d'*E. coli* aux antibiotiques;
- extraire l'ADN de ces bactéries et le tester pour déterminer la prévalence des gènes de virulence et d'antibiorésistance.

Cette étude comprend deux parties : la première dite bibliographique est consacrée aux généralités sur les *E. coli*. La deuxième partie qui constitue notre travail personnel, traite du matériel et des méthodes que nous avons utilisés pour conduire ce travail, des résultats obtenus suivis de leur discussion et de quelques recommandations à l'endroit des acteurs de la filière avicole.

## PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre I : Généralités sur les *E.coli*

#### I.1 Classification

De la famille des *Enterobacteriaceae*, *E. coli* ou colibacille est une bactérie à Gram négatif, non sporulée, aéro-anaérobie facultative et à mobilité péritriche. Il existe deux types d'*E. coli* : les *E. coli* constitutifs de la microflore digestive de l'Homme et des animaux et les *E. coli* pathogènes pour leur hôte. Le groupe des pathogènes est encore divisé en deux sous-groupes selon leur tropisme d'organes : les souches à tropisme intestinal et celles à tropisme extra-intestinal ou invasives. La bactérie est caractérisée par des antigènes de la paroi (Ag O), de la capsule (Ag K), du flagelle (Ag H) et du pilus ou fimbriae (Ag P ou Ag F). Chez la volaille, les *E. coli* pathogènes sont appelés APEC (Avian Pathogenic *E. coli* pour *E. coli* pathogènes aviaires) par opposition aux souches commensales qui elles, sont désignées par AFEC (Avian Fecal *E. coli* ou *E. coli* fécaux aviaires). Les APEC font partie du grand groupe des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) et sont, à ce titre, désignés sous le vocable « ExPEC aviaires » (Mainil, 2003; Kern-Benaïbout, 2006).

#### I.2 Sérotypes et Pathotypes des *E. coli*

##### 1.2.1 Sérotypes des *E. coli* aviaires

Chez les APEC, il existe trois sérotypes majeurs que sont O1 : K1, O2 : K1 et O78 : K80 (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999); le sérotype O78 : K80 étant le plus pathogène (Robineau et Moalic, 2010). Le sérotypage des *E. coli* se fait par agglutination en utilisant des sérums contenant des anticorps spécifiques des antigènes de la bactérie. Cependant, cette technique de sérotypage ne donne pas toujours des résultats fiables pour deux raisons (Robineau et Moalic, 2010) : d'abord il y a la mauvaise qualité des réactifs (anti-sérum produit à partir des lapins) et ensuite, certains APEC n'agglutinent pas nécessairement avec le sérum de référence. Pour cela, selon le laboratoire de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (O.I.E) pour *E. coli* (EcL) (<http://www.ecl-lab.com>), on peut faire recours à la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) pour détecter les sérotypes.

##### 1.2.2 Pathotypes des *E. coli*

Les colibacilles pathogènes sont divisés en plusieurs classes appelées pathotypes. Cette classification est basée sur les différents mécanismes qui causent la maladie. Ainsi, le laboratoire EcL reconnaît les pathotypes suivants :

- ETEC : Enterotoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli* entérotoxinogènes);

- STEC : Shigatoxin producing *E. coli* (*E. coli* producteurs de la toxine Shiga);
- AEEC : Attaching and Effacing *E. coli* (*E. coli* inducteurs de lésions de type attachant et effaçant);
- ExPEC : Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (*E. coli* pathogènes extra-intestinaux);
- UPEC : Uropathogenic *E. coli* (*E. coli* uropathogènes);
- APEC : Avian Pathogenic *E. coli* (*E. coli* pathogènes aviaires).

### 1.2.3 Sources animales des différents pathotypes d'*E.coli* potentiellement zoonotiques

*E. coli* est une bactérie ubiquiste qui fait partie de la flore normale du tube digestif de la plupart des espèces animales, y compris les mammifères et les oiseaux. Les souches pathogènes (pathotypes) ne représentent généralement qu'une infime partie et ne semblent pas avoir de spécificité d'hôte.

La source principale des APEC est la volaille, plus précisément les animaux de moins de trois semaines (**Stordeur et Mainil, 2002**). Aucune étude n'a, à ce jour, fait état du portage des APEC par des espèces animales autres que les volailles. Quant aux STEC, de nombreuses espèces animales sont connues pour être des sources. Ainsi, **Fairbrother et Nadeau (2006)** répartissent les STEC en quatre types avec chacun, des réservoirs animaux :

- le type zoonotique (correspondant au sérotype O157) dont les réservoirs animaux sont les bovins, les caprins, les ovins et les porcins;
- les types zoonotiques non-O157 (correspondant aux sérotypes O26, O111, O103, O113 et O145) qui ont pour hôtes réservoirs, les bovins, les ovins, les caprins, les porcins et les poulets;
- les types potentiellement zoonotiques (incluant les sérotypes O17, O56, O87, O108, O109, O130, O136 et O149) ayant pour hôtes réservoirs les bovins, les ovins, les caprins et les porcins;
- enfin les types propres aux animaux (comprenant les sérotypes O138, O139 et O141) dont l'espèce réservoir est le porc.

Concernant les ETEC, **Kern-Benaibout (2006)**, rapporte que les ETEC des animaux ne sont pas directement pathogènes pour l'Homme. Selon cet auteur, les sources animales des ETEC sont les porcs, les veaux, les agneaux et les chevreaux diarrhéiques. Pour ce qui est des EPEC, **Wales et al. (2005)** citent les bovins, les petits ruminants et les carnivores comme étant les principales

sources animales. Enfin, les UPEC et les ExPEC autres qu'aviaires ont pour hôtes réservoirs, les bovins et les porcins (**Mainil et Van Bost, 2004**).

#### **1.2.4 Facteurs et gènes de virulence associés aux *E. coli***

##### **1.2.4.1 Facteurs et gènes de virulence des ExPEC aviaires (APEC)**

Les ExPEC aviaires sont les pathotypes extra-intestinaux des *E. coli*. Ces pathotypes possèdent des facteurs de virulence parmi lesquels, les plus importants sont :

- le système de captation du fer : le fer est utile à la multiplication des *E. coli* dans le sang (**Zhao et al., 2009**). Or dans l'organisme, le fer libre (fer ferreux, seul utilisable par les bactéries) est rare. Ces micro-organismes ont donc développé des mécanismes leur permettant de détourner ce fer à leur profit. Ainsi, pour capter ce métal, les *E. coli* sécrètent de petites molécules appelées aéro bactéines qui ont une très grande affinité pour le fer. Cette affinité aboutit à la formation d'un complexe fer-aéro bactéine. En même temps, les bactéries s'équipent à leur surface de protéines transporteuses permettant l'entrée en leur sein de ce complexe. L'aéro bactéine est codée par le gène *iuc* (iron uptake chelate ou système de chélation du fer);
- le facteur d'adhésion ou fimbriae P : l'adhésion est une étape clef dans le développement du processus infectieux et chez les *E. coli*, le fimbriae P est impliqué dans l'adhérence aux cellules uro-épithéliales. Les facteurs impliqués dans la structure et le fonctionnement du fimbriae P sont codés par un groupe de 11 gènes *Pap* (pyelophretis-associated pili ou pili associés aux pyélonéphrites), notamment les gènes *papI, papB, papA, papH, papC, papD, papJ, papK, papE, papF et papG* (**Mellata, 2003**);
- l'hémagglutinine sensible à la température ou Tsh (temperature sensitive hemagglutinin) : la Tsh est un facteur de virulence dont le rôle serait de stimuler la réaction inflammatoire et le développement des lésions avec dépôt de fibrine dans les sacs aériens (**Mainil et Van Bost, 2004**). Ce facteur est encodé par le gène du même nom, c'est-à-dire le gène *tsh*;
- la cytotoxine : les ExPEC sont des pathotypes producteurs de la toxine CNF (Cell Necrotising Factor ou facteur nécrosant des cellules). Cette toxine, associée aux souches responsables de diarrhées et d'infections du tractus urinaire (**Kern-Benaibout, 2006**), est contrôlée par le gène *cnf*.

##### **1.2.4.2 Facteurs et gènes de virulences des autres pathotypes d'*E. coli***

Les pathotypes d'*E. coli* autres que les APEC peuvent être pathogènes pour les autres espèces animales et/ou pour l'Homme. C'est le cas des STEC qui peuvent



coloniser le caecum de poulets et s'y développer; ceux-ci jouant un rôle de réservoir (**Beery et al., 1985** cités par **AFSSA, 2003**). Les facteurs et gènes de virulence de ces pathotypes sont résumés dans le **Tableau I**.

**Tableau I :** Facteurs et gènes de virulence des autres pathotypes d'*E. coli*.

Path.	Facteurs	Pathogénie	Gènes	Référence
	Fimbriae F	Adhérence aux villosités intestinales	<i>F4 et F18</i>	Nagy et Fekete (1999)
ETEC	Entérotoxines LT, STa et STb	Hypersécrétion des Cl <sup>-</sup> , malabsorption digestive	<i>LT, STa, STb</i>	<a href="http://www.eci-lab.com">http://www.eci-lab.com</a>
	Shigatoxines stx1 et stx2	Production de cytokines et apoptose cellulaire	<i>stx1, stx2</i>	
STEC	Attachement/effacement	Attachement/effacement des villosités intestinales	<i>eae</i>	Farooq et al. (2009)
	Hémolysine	SHU*	<i>ehx</i>	
AEEC	Attachement/effacement	Lésions d'attachement et d'effacement des villosités intestinales	<i>eae</i>	Kern-Benaibout (2006)

Path. : Pathotypes; SHU\* : Syndrome Hémolytique et Urémique.

#### 1.2.4.3 Prévalence des gènes de virulence des ExPEC dans le monde

Au Sénégal, il n'y a pas encore eu, à notre connaissance, d'études portant sur la prévalence des gènes des *E. coli* aviaires. Ailleurs dans le monde en revanche, cette prévalence a fait l'objet de quelques études par la technique PCR. C'est le cas notamment en Corée du sud où **Lee et al. (2009)** ont obtenu, sur 41 carcasses de volailles, une prévalence de 2,4% pour le gène *eae*. En Espagne, **Cortés et al. (2010)** ont étudié 57 échantillons d'*E. coli* provenant de la flore digestive de poulets cliniquement sains. Les gènes étudiés et les prévalences correspondantes sont *iucD* (43,9%); *tsh* (21,1%), *papC* (14%) et *cnf* (0%). **Kylie et al. (2005)** rapportent aux USA, après examen de 104 souches d'*E. coli* isolées des fèces de poulets sains, des prévalences de 41,3%, 9,6% et 1% respectivement pour les gènes *tsh*, *papC* et *cnf*. **Maturana et al. (2011)** ont obtenu, lors d'une étude de 31 AFEC au Brésil, une prévalence de 10% pour le gène *tsh*. Enfin au Canada, **Bonnet et al. (2009)** rapportent sur 197 isolats d'AFEC étudiés, des prévalences de 0%, 11,2%, et 12,2% pour les gènes *papC*, *tsh* et *iucD* respectivement.

### **I.3 Importance des *E. coli* en aviculture**

L'importance des *E. coli* aviaires (APEC) revêt les deux aspects majeurs suivants :

- aspect économique : les APEC sont responsables des infections bactériennes (colibacilloses) aviaires les plus fréquemment rencontrées dans les élevages avicoles (surtout chez les poulets de chair) et leur importance économique tient aux pertes par mortalité et par morbidité qu'elles engendrent. Selon **Yogarathnam (1995)** cité par **Stordeur et Mainil (2002)**, en Angleterre, 43% des saisies opérées dans les abattoirs de volailles sont dues aux lésions colibacillaires et les pertes économiques annuelles imputées à cette pathologie, hormis les frais en antibiothérapie, sont estimées entre 5 et 6 millions d'euros;
- aspect hygiénique : certains APEC partagent les mêmes facteurs de virulence avec les ExPEC de l'Homme (**Bauchart et al., 2010**) et parmi les pathologies aviaires transmissibles à l'Homme, la colibacillose figure en bonne place (**Kabir, 2010**).

## **Chapitre II. Résistance des *E. coli* aux antibiotiques**

L'antibiorésistance se définit comme la capacité d'une souche bactérienne à survivre et se multiplier en présence d'une concentration élevée d'antibiotique. Cette résistance peut être naturelle ou acquise.

La résistance naturelle est programmée dans le génome bactérien. Elle est fixe, constante à l'intérieur d'un même taxon et à transmission verticale.

La résistance acquise est celle qui apparaît chez des souches jusqu'alors sensibles aux antibiotiques, consécutivement à des modifications de l'équipement génétique. Elle ne concerne que quelques souches d'une même espèce et se transmet horizontalement.

Qu'elle soit naturelle ou acquise, l'apparition de l'antibiorésistance est le plus souvent associée à des déterminants génétiques de la résistance microbienne.

### **II. 1 Supports génétiques de l'antibiorésistance**

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être portés par des chromosomes (résistance chromosomique) ou par des éléments extrachromosomiques appelés plasmides (résistance plasmidique).

#### **II.1.1 Résistance chromosomique**

La résistance chromosomique résulte généralement d'une mutation au niveau de l'ADN chromosomique, affectant spécifiquement le mécanisme d'action d'un antibiotique ou d'un groupe d'antibiotiques. Cette résistance se caractérise, selon **Guillot (1990)**, par :

- sa faible fréquence d'apparition de l'ordre du milliardième au millionième. Ainsi, la résistance chromosomique à plusieurs antibiotiques à la fois, a une très infime probabilité d'apparition;
- sa spontanéité car elle apparaît en absence d'antibiotique;
- sa stabilité et son aspect héréditaire : lors de la division bactérienne, la bactérie mutée transmet son caractère antibiorésistant aux bactéries filles.

#### **II.1.2 Résistance extrachromosomique ou plasmidique**

Les plasmides sont des structures extrachromosomiques constituées d'ADN bicaténaire circulaire, se répliquant de façon autonome. Leur transmission, stable au cours des générations, peut se faire entre des bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes (**Guillot, 1990**). L'une des conséquences de cette facilité de transmission intra et interspécifique est que la résistance plasmidique peut intéresser plusieurs antibiotiques à la fois (multirésistance due au plasmide R) et elle représente 90% des cas d'antibiorésistance. Enfin, la

résistance plasmidique ne concerne pas que les antibiotiques car elle est étendue aux métaux lourds (Guillot, 1990).

Indépendamment des supports génétiques, plusieurs mécanismes biochimiques sont impliqués dans l'expression de la résistance. Ainsi, quatre types de mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux antibiotiques sont décrits (Davies, 1979 cité par Guillot, 1990) :

- la non-fixation de l'antibiotique suite à la modification de sa cible;
- la synthèse d'enzymes bactériennes modifiant ou inactivant l'antibiotique;
- la diminution de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique;
- l'utilisation d'une nouvelle voie métabolique remplaçant la voie inhibée par l'antibiotique.

## **II.2 Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

### **II.2.1 Usage des antibiotiques en production animale**

Après leur large succès en médecine humaine, l'usage des antibiotiques s'est progressivement étendu aux animaux. De nos jours, ces molécules ne sont plus utilisées dans un but exclusivement thérapeutique. En effet, depuis la découverte de leur rôle d'activateur de la croissance, les antibiotiques sont de plus en plus incorporés, à des doses sous-thérapeutiques, dans l'alimentation du bétail. En Europe où l'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance est bannie de nos jours, dans un passé encore très récent, en moyenne 100 mg d'antibiotiques étaient administrés aux animaux pour produire 1 kg de viande destinée à la consommation humaine (O.M.S, 2000). Ces statistiques ne sont pas disponibles dans les pays en voie de développement. Toutefois, l'O.M.S estime que l'accroissement de la production des viandes dans ces pays est souvent lié à l'usage intensif d'antibiotiques pour traiter et activer la croissance des animaux. Or, certains de ces activateurs de croissance appartiennent à des groupes d'antibiotiques (comme les glycopeptides) essentiels pour traiter certaines maladies mortelles pour l'Homme. Leur usage à des doses sous-thérapeutiques est cité comme le plus important facteur de sélection des souches multirésistantes aux antibiotiques (Miles, 2006; Bonnet et al., 2009). Cette sélection s'exerce non seulement sur les bactéries pathogènes, mais également sur la flore commensale. C'est le cas de l'usage abusif d'antibiotiques en production aviaire qui aboutit à la sélection des souches résistantes d'*E. coli* dont celles appartenant à la flore digestive (Miles et al., 2006).

### **II.2.2 Prévalence de l'antibiorésistance des *E. coli***

Ces dernières années, dans le monde entier, l'antibiorésistance a pris des proportions inquiétantes. Pour comprendre ce phénomène et tenter d'y apporter

des solutions, des études ont été menées un peu partout dans le monde sur la résistance des *E. coli* isolés des poulets de chair. Le tableau II présente quelques-unes de ces études.

**Tableau II :** Fréquences (%) d'antibiorésistance des isolats d'*E. coli* aviaires dans quelques pays.

	Sénégal		Chine	Canada	U.S.A	
Auteurs (année)	Fofana et al. (2004)	Diouf (2006)	N'Diaye (2010)	Yang et al. (2004)	PICRA (2009)	Johnson et al. (2011)
Nombre d'isolats	90	85	54	71	171	422
Sources des isolats	Carcasses		Lésions*		Carcasses	Fèces
Gentamicine	3,33	3,00	0,00	30,00	11,69	17,1
Triméthoprime	73,33	87,69	ND	63,00	9,35	7,30
Streptomycine	56,67	52,30	ND	80,00	45,02	44,50
Amoxicilline	ND	ND	75,93	0,00	31,57	13,00
Ampicilline	55,56	41,61	74,08	77,00	43,27	26,5
Cefoxitine	12,00	28	ND	ND	31,57	12,6
Ceftiofur	ND	ND	ND	0,00	28,65	10,7
Ceftriaxone	ND	ND	ND	0,00	30,99	12,6
Acide nalidixique	54,44	50,00	ND	100	4,50	4,30
Ciprofloxacine	8,00	5,00	ND	73,00	0,00	0,2
Chloramphénicol	18,00	6,00	ND	24,00	8,18	9,2
Tétracycline	88,89	90,76	98,15	100	43,85	49,10
Kanamycine	ND	ND	ND	ND	14,62	18,10
Amikacine	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00
Sulfisoxazole	ND	ND	ND	ND	36	ND

Lésions\* : organes portant des lésions colibacillaires, ND : Donnée non disponible; PICRA : Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antibiotiques.

### II.2.3 Gènes de résistance des *E. coli* aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques est souvent due à la présence d'un ou de plusieurs gènes qui commandent cette résistance. En ce qui concerne les

*E. coli*, un certain nombre de gènes est identifié comme étant à l'origine de la résistance des souches à des antibiotiques ou familles d'antibiotiques spécifiques (**Tableau III**).

**Tableau III:** Gènes de résistance des *E. coli* aviaires à quelques antibiotiques.

Antibiotiques	Gènes de résistance	Références
Ampicilline	<i>bla<sub>OXA</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Smet et al. (2010)
Ceftiofur	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	Li et al. (2010)
Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M15</sub></i>	Randall et al. (2011)
Quinolones	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>aac</i>	Liut et al. (2011)

*bla<sub>Oxa</sub>* : gène codant pour la β-lactamase-oxacillinase; *bla<sub>TEM</sub>* : gène codant pour une β-lactamase isolée pour la 1<sup>ère</sup> fois chez un patient du nom de Temoniera en Grèce; *bla<sub>SHV</sub>* : gène codant pour la β-lactamase Sulfi-Hydroxyl Variable; *bla<sub>CMY</sub>* : gène codant pour la β-lactamase-cephamycine; *bla<sub>CTX</sub>* : gène codant pour la β-lactamase-cefotaximase; *qnr* : gène de résistance aux quinolones; *aac* : gène codant pour l'aminoglycoside acétyltransférase (enzyme inactivant les quinolones).

La prévalence de certains de ces gènes dans les isolats d'*E. coli* aviaires a été étudiée par quelques auteurs. **Brinas et al. (2002)** rapportent des prévalences de 0%, 4,54% et 77,30% respectivement pour les gènes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>* dans 22 souches d'*E. coli* isolées de poulets de chair en Espagne. En Grande-Bretagne, **Randall et al. (2011)** ont observé, en appliquant la méthode PCR, que 54,50% des 388 souches AFEC étudiées étaient positives au gène *bla<sub>CTX-M</sub>*. **Cortés et al. (2010)** rapportent, après avoir examiné 57 isolats fécaux d'*E. coli* aviaires en Espagne, les prévalences de 17,50%, 8,80% et 3,50% respectivement pour les gènes *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>*.

## DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

### Chapitre I : Matériel et méthodes

#### I.1 Matériel

##### I.1.1 Zone de l'étude

L'étude a été effectuée dans la zone péri-urbaine de Dakar. Les échantillons ont été collectés entre juin et juillet 2011 puis analysés au laboratoire de microbiologie de l'EISMV de Dakar en ce qui concerne l'isolement des souches d'*E. coli* et au laboratoire de référence de l'OIE pour *E. coli* (EcL), sis à l'Université de Montréal (Canada) pour la caractérisation génétique et l'antibiogramme.

##### I.1.2 Matériel d'étude

Le matériel d'étude est constitué d'échantillons de fèces (50), d'eau d'abreuvement (50), d'eau de rinçage des carcasses (8) et d'écouvillons de carcasses (10). Ces 118 échantillons ont été prélevés dans 32 fermes.

##### I.1.3 Matériel de prélèvement et d'analyse de laboratoire

Le matériel de prélèvement comprend des spatules en bois, des flacons et sachets en plastique, une glacière et des carboglaces. Quant au matériel de laboratoire, il se distingue en deux groupes. Le premier, est celui du petit matériel constitué entre autres de pipettes, de boîtes de pétri, de tubes, de béchers, d'Erlens etc., de divers milieux de culture (Mac Conkey, Mueller Hinton, Luria Bertani (LB), bouillon de soja tryptique (TSB), TSB modifié (mTSB), solution tampon ou FA buffer) et des réactifs (amorces d'ADN, Taq polymérase, dNTP, chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ), etc.). Le deuxième groupe est celui du gros matériel composé d'une hotte biologique, de centrifugeuses, du thermocycleur, de l'appareil d'électrophorèse, de l'appareil d'acquisition des images, etc. (**Figure 1**).



a. Thermocycleur (Bio Rad)



b. Appareil d'électrophorèse (Bio Rad)



c. Appareil de prise d'image (MBI Lab Equipment)

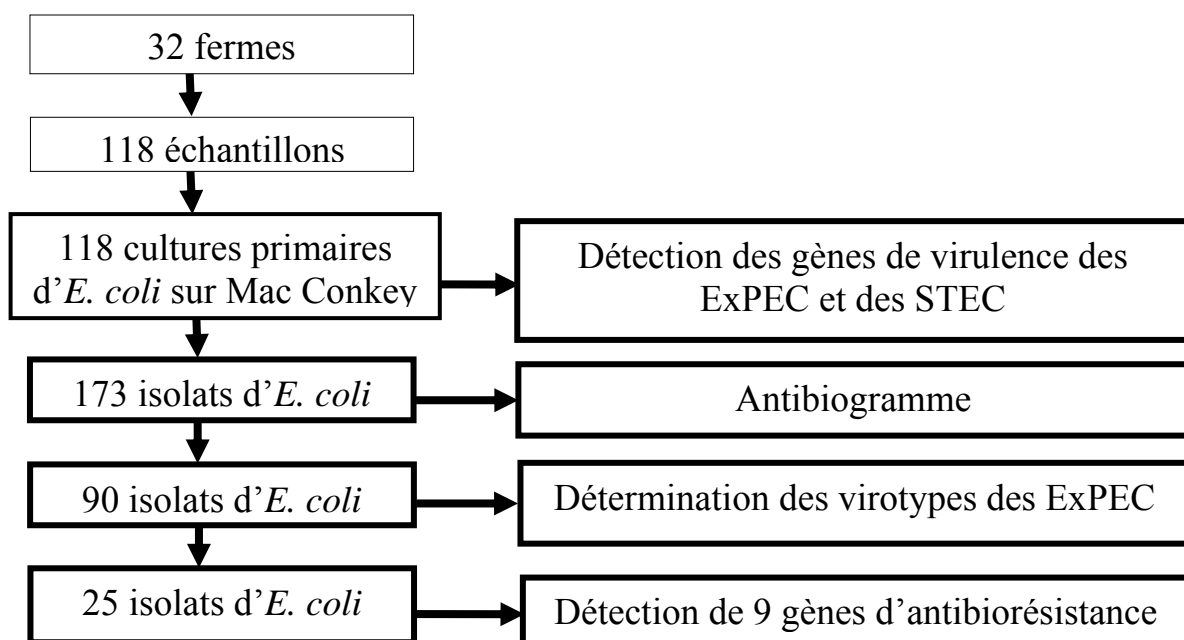
**Figure 1:** Matériel de PCR, d'électrophorèse et de prise d'image.

## I.2 Méthodes

### I.2.1 Collecte des données sur le terrain

Pour déterminer le nombre de fermes nécessaires à notre étude, nous avons utilisé la liste des fermes issue du recensement effectué par la direction de l'élevage du Sénégal (DIREL) en 2008. Cette liste a été actualisée auprès des cliniciens installés en clientèle privée dans la zone d'étude. Ce nombre a été déterminé avec le logiciel *Winepiscopes* © [version 2.0] sur la base d'un total de 68 fermes de poulets de chair réparties sur 17 localités, d'une prévalence des *E. coli* de 80% dans les exploitations avicoles et d'un risque d'erreur fixé à 10%. Ainsi, 32 fermes issues de 8 localités ont été retenues pour cette étude sur la base d'un échantillonnage à deux degrés. Dix-huit (18) des trente-deux (32) fermes comptaient plus d'un bâtiment d'élevage abritant des volailles et dans ces fermes, le prélèvement avait été effectué dans deux bâtiments différents; ce qui nous a permis d'avoir un total de 118 échantillons. Chaque échantillon de fèces ou d'eau d'abreuvement est constitué d'un pool de 5 prélèvements faits dans différents endroits du bâtiment ou dans différents abreuvoirs. Les eaux d'abattage et les écouvillons n'ont été prélevés que dans les fermes qui possédaient en leur sein, des abattoirs ou des aires d'abattage. Ces prélèvements n'ont pas été effectués dans les tueries communes afin d'éviter les contaminations croisées. Mais durant notre étude, très peu d'abattages avaient eu lieu dans les élevages. Les échantillons prélevés ont été conservés sous carboglaces et transportés au laboratoire de microbiologie de l'EISMV où ils ont été analysés. Par ailleurs, les données relatives à l'hygiène et à l'utilisation des antibiotiques dans les fermes ont été recueillies sur des fiches d'enquête.

### I.2.2 Méthodes d'analyse de laboratoire



**Figure 2 :** Approche méthodologique des analyses de laboratoire



### **I.2.2.1 Isolement des souches d'*E. coli***

Les différents échantillons collectés ont été analysés au laboratoire de microbiologie de l'EISMV afin d'y isoler les souches d'*E. coli*. Les méthodes utilisées sont les suivantes :

#### ➤ **Isolement à partir des échantillons fécaux**

- chaque échantillon a été pesé puis homogénéisé dans de l'eau peptonnée-tamponnée (EPT), selon le rapport 1/10 (1 g de fèces pour 10 ml d'EPT);
- le filtrat a été utilisé pourensemencer la gélose Mac Conkey en utilisant pour le premier quadrant, un coton-tige et pour les autres quadrants, une anse à usage unique afin de produire la culture primaire de chaque échantillon fécal;
- la gélose et le sachet de bouillon fécal ont ensuite été incubés à 37°C pendant 18 à 20h;
- les boîtes ayant présenté une croissance bactérienne suffisante ont été scellées avec un parafilm et conservées à +4°C jusqu'à leur envoi au laboratoire EcL. Lorsque la croissance est insuffisante, d'autres géloses étaientensemencées à l'aide du bouillon fécal précédemment incubé.

#### ➤ **Isolement à partir des eaux de boisson et des eaux de rinçage des carcasses (même protocole)**

- 250 ml d'eau collectée ont été centrifugés à 8000 tours/mn pendant 15 mn dans des flacons; le surnageant a été jeté en gardant 2 ml du sédiment;
- ce sédiment a été prélevé avec une anse pourensemencer le milieu Mac Conkey et parallèlement, quelques microlitres ont été prélevés avec une pipette et inoculés dans un tube contenant 10 ml de TSB;
- le Mac Conkey et le TSBensemencés ont été incubés à 37°C pendant 18 à 20h;
- les boîtes de pétri ont ensuite été scellées et conservées à +4°C lorsque la croissance était suffisante; au cas contraire, d'autres géloses étaientensemencées à l'aide du bouillon TSB précédemment incubé.

#### ➤ **Isolement des *E. coli* à partir des écouvillons de carcasses**

- les écouvillons ont été sortis de leur étui etensemencés directement sur des géloses Mac Conkey puis dans 10 ml de bouillon TSB;
- après incubation de ces milieux à 37°C pendant 18 à 20h, les boîtes sur lesquelles la croissance bactérienne était suffisante ont été scellées et

conservées à +4°C. Sinon d'autres géloses Mac Conkey étaient ensemencées à l'aide du bouillon TSB précédemment incubé.

### **I.2.2.2 Antibiogramme**

Le test d'antibiogramme n'a concerné, compte tenu de notre séjour limité au laboratoire EcL, que 12 des 32 fermes étudiées. Ainsi, 173 isolats d'*E. coli* (soit 4 isolats par échantillon provenant des 12 fermes) ont été testés pour leur sensibilité à 15 antibiotiques appartenant à 6 familles. La méthode utilisée est celle de la diffusion en gélose des disques d'antibiotiques, telle que spécifiée par le « Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ». Les antibiotiques utilisés sont les suivants : l'amikacine (**AN**), la gentamicine (**GM**), la kanamycine (**K**), la streptomycine (**S**), l'amoxicilline (**AMC**), l'ampicilline (**AM**), la cefoxitine (**FOX**), le ceftiofur (**XNL**), le ceftriaxone (**CRO**), la ciprofloxacine (**CIP**), l'acide nalidixique (**NA**), le chloramphénicol (**C**), le sulfisoxazole (**G**), le triméthoprim-sulfaméthoxazole (**SXT**) et la tétracycline (**TE**). A l'exception du chloramphénicol qui est proscrit d'utilisation, ce sont tous des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et/ou en médecine humaine et sur lesquels le PICRA mène une surveillance d'antibiorésistance.

Sur le milieu Mac Conkey portant les cultures primaires, 4 isolats lactose positifs ont été choisis pour chaque échantillon et ensemencés distinctement sur de la gélose au sang. Au bout de 18 à 20h d'incubation à 37°C, ils ont été soumis à trois tests biochimiques (indole, citrate et mobilité). Après obtention des critères d'appartenance aux *E. coli* (indole +, citrate – et mobilité +), chaque isolat a été repiqué sur une nouvelle gélose au sang puis incubé à 37°C pendant 18-20h. Une petite quantité de chaque isolat est inoculé après cette incubation dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Le contenu du tube est homogénéisé quelques secondes au vortex puis le tube introduit dans l'orifice d'un turbidimètre préalablement calibré. Lorsque ce dernier affiche une turbidité de 50%, la solution est prélevée avec un coton-tige et ensemencée en tapis sur toute la surface d'une gélose Mueller-Hinton. Le milieu Mueller-Hinton ainsi ensemencé est laissé au repos pendant 5 mn et, après dépôt des disques d'antibiotiques à l'aide du distributeur de disques, le milieu est incubé à 37°C pendant 18 à 20h. L'interprétation est faite qualitativement après cette incubation en mesurant le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne, qui se matérialise par un halo clair autour du disque d'antibiotique et en comparant, pour chaque disque d'antibiotique, ce diamètre au standard fourni par le CLSI.

### I.2.2.3 Caractérisation génétique des *E. coli*

#### ➤ Extraction de l'ADN bactérien

Les cultures bactériennes primaires présentes sur le milieu Mac Conkey ont été préparées à l'extraction comme suit : une strie du premier quadrant a été prise avec une anse et inoculée dans 5 ml de bouillon LB et 5 ml de bouillon mTSB. Après une incubation à 37°C pendant 18-20h, l'ADN a été extrait selon le protocole suivant : chaque échantillon a d'abord été identifié par un code sur un tube de 1,5 ml. Dans ce tube, 1 ml de la culture LB ou mTSB incubée 18-20h à 37°C a été centrifugé pendant 2 mn, à 12000 tours/mn. Le surnageant a été jeté et remplacé par 1 ml de solution tampon (FA buffer). Le culot ayant été remis en suspension à l'aide du vortex, la suspension a encore été centrifugée à 12000 tours/mn pendant 2 mn. Le surnageant a, à nouveau été jeté et remplacé par 0,5 ml d'eau distillée stérile. Après une remise en suspension (vortex) et un chauffage des tubes pendant 10 mn dans de l'eau portée à ébullition, ils ont été centrifugés une dernière fois à 12000 tours/mn pendant 2 mn. Le surnageant (contenant l'ADN bactérien) de chaque tube a été transféré dans un nouveau tube identifié et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour la réaction PCR.

Il faut préciser que l'ADN extrait du milieu LB a été utilisé pour la recherche des gènes de virulence des ExPEC alors que celui extrait du mTSB (TSB modifié par ajout de sels biliaries) a servi à la recherche des gènes de virulence des STEC. En effet, la recherche des gènes des STEC nécessite qu'il y ait dans le milieu, le moins possible de bactéries autres que les STEC et le rôle des sels biliaries est justement d'inhiber la croissance de ces bactéries indésirables.

#### ➤ Mise au point de la réaction PCR

La première étape d'une réaction PCR a consisté à préparer la solution mère ou master-mix (les différents master-mix sont présentés à l'annexe I). Les tubes PCR ont été préparés comme suit : homogénéiser (vortex) le master-mix et mettre 20 µl dans chaque tube PCR portant l'identification de l'échantillon. Ajouter aux 20 µl de master-mix, 5 µl d'extrait d'ADN à tester. Homogénéiser quelques secondes dans une micro-centrifugeuse puis disposer les tubes PCR dans le thermocycleur et faire les cycles de température appropriés (Annexe I).

Trois types de réactions PCR ont été effectués :

- le premier est celui de deux PCR multiplexes : l'une pour la recherche des gènes de virulence des ExPEC (*iucD*, *tsh*, *papC* et *cnf*) et l'autre pour la détection des gènes de virulence des STEC (*eae*, *stx1* et *stx2*). Ces PCR ont porté chacune sur les 118 échantillons. Le **Tableau IV** présente les gènes testés, les séquences d'amorces de ces gènes ainsi que les souches de contrôle positives utilisées dans chaque PCR.

**Tableau IV :** Liste des gènes de virulence testés, des amorces et des souches de contrôle positives utilisées dans les PCR.

Facteurs	Gènes	Séquences des amorces	TM (pb)	Souches de contrôle positives
Aérobactine	<i>iucD</i>	For 5' AAGTGTCGATTTTATACATAAC	778	ECL 17088
		Rev 5' CCATCCGATGTCAGTTTTCTG		
TSH	<i>tsh</i>	For 5' GGTGGTGCACCTGGAGTGG	640	ECL 17088
		Rev 5' AGTCCAGCGTGATAGTGG		
Fimbriae P	<i>papC</i>	For 5' GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	501	ECL 13421
		Rev 5' ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
Cyto-necrotising factor	<i>cnf</i>	For 5' TTATATAGTCGTCAAGATGGA	446	ECL 13421
		Rev 5' CACTAAGCTTTACAATATTGAA		
Attachement/effacement	<i>eae</i>	For 5' CATTATGGAACGGCAGAGGT	790	ECL 6611
		Rev 5' ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA		
Shiga-toxines	<i>stx1</i>	For 5' TTAGACTTCTCGACTGCAAAG	531	ECL 6611
		Rev 5' TGTTGTACGAAATCCCCTCTG		
	<i>stx2</i>	For 5' TTATATCTGCGCCGGGTCTG	327	ECL 6611
		Rev 5' AGACGAAGATGGTCAAACG		

A : adénine, C : cytosine, G : guanine, T : thymine, TSH : hémagglutinine thermosensible, TM : taille moléculaire, pb : paires de bases, For : forward (brin principal); Rev : reverse (brin complémentaire).

- le deuxième type de PCR est une PCR multiplexe effectuée sur 90 isolats tirés au hasard parmi les 173 testés par antibiogramme. Cette PCR est faite dans le but de rechercher les virotypes des ExPEC (un virotype étant une combinaison spécifique des gènes de virulence d'un ou de plusieurs pathotypes au sein d'un seul isolat). Le master-mix, les amorces, les contrôles positifs ainsi que les cycles de températures sont les mêmes que ceux de la PCR faite précédemment pour les ExPEC;
- le troisième type de PCR est un ensemble de 9 PCR uniplexes destinées à rechercher 9 gènes de résistance aux antibiotiques (**Tableau V**). Vingt et cinq (25) isolats résistants à au moins un de ces antibiotiques, choisis parmi les quatre-vingt et dix (90) isolats précédents ont fait l'objet de ces PCR. Le but de ces PCR était simplement d'avoir une idée préliminaire des gènes de résistance aux antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire et humaine (ampicilline, quinolones) ou utilisés uniquement en deuxième intention (en cas d'échec thérapeutique) comme le ceftiofur ou le ceftriaxone. C'est pour cette raison que nous-nous sommes limités à l'examen de 25 isolats. L'ADN des isolats a été extrait selon le même protocole après ensemencement sur milieu LB.

**Tableau V :** Liste des gènes de résistances aux antibiotiques testés, des amorces et des souches de contrôle positives utilisées dans les PCR.

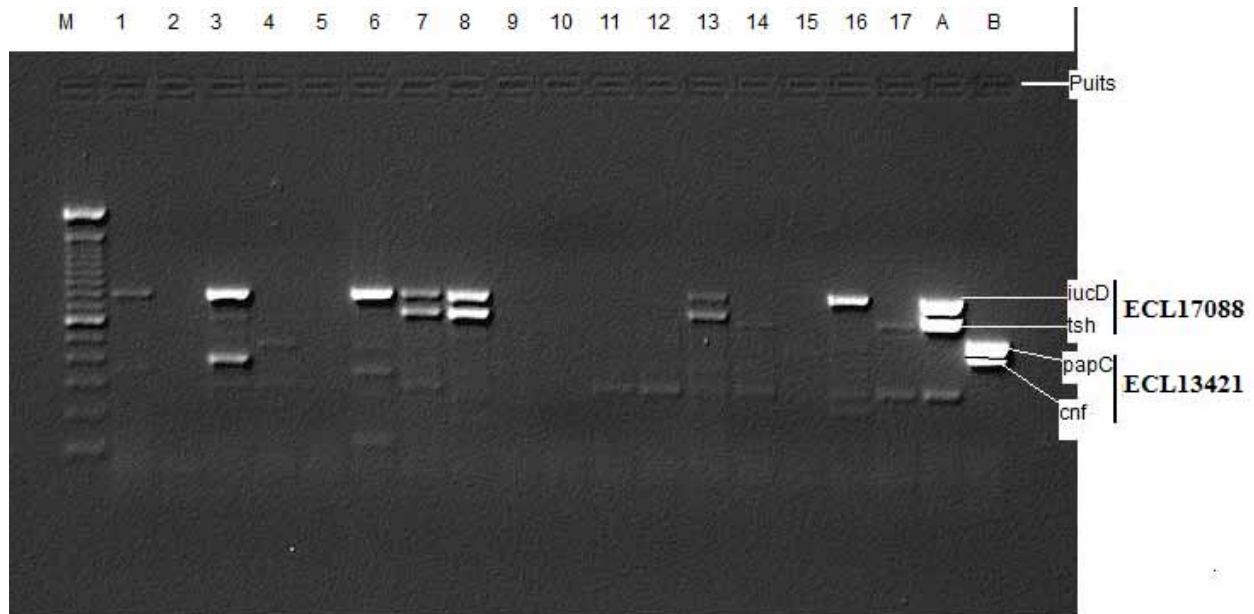
Antibiotiques	Gènes	Séquences des amorces	TM (pb)	Souches de contrôles positives
Ceftiofur	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	For 5'GACAGCCTCTTTCTCCACA	1000	ECL3482
		Rev 5'TGGAACGAAGGCTACGTA		
Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	For 5'GCCGTCTAAGGCGATAACA	996	SUR255
		Rev 5'CACACGTGGAATTTAGGGACT		
Ampicilline	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	For 5'GAGTATTCAACATTTTCGT	857	ECL3482
		Rev 5'ACCAATGCTTAATCAGTGA		
	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	For 5'GCAGCGCCAGTGCATCAAC	198	ECL12572
		Rev 5'CCGCATCAAATGCCATAAGTG		
	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	For 5'TCGCCTGTGTATTATCTCCC	768	PMON38
		Rev 5'CGCAGATAAATCACCACAATG		
Quinolones (CIP, NA)	<i>qnrA</i>	For 5'TCAGCAAGAGGATTTCTCA	627	J53pMG252
		Rev 5'GGCAGCACTATTACTCCCA		
	<i>qnrB</i>	For 5'GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	J53pMG293
		Rev 5'ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
	<i>qnrS</i>	For 5'ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	J53pMG306
		Rev 5'TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
	<i>aac(6)</i>	For 'TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	J53pMG293
		Rev 5' CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		

### ➤ Electrophorèse sur gel d'agarose

De la poudre d'agarose (2,3 g) a été dissoute dans 30 ml de solution tampon en y ajoutant 3 µl de colorant SYBr. Ce colorant est un fluorophore qui présente une très bonne sensibilité car il permet la visualisation sur gel d'agarose, de très faibles quantités (de l'ordre du femtogramme) de fragments d'ADN double brin. Le liquide a été versé dans un moule dans lequel était disposé un peigne à 20 dents. Après environ une heure à l'abri de la lumière (pour éviter la dénaturation du SYBr), le gel s'est condensé et le retrait du peigne a laissé place à des puits destinés à recevoir les produits de la PCR préalablement colorés au de bleu de bromophénol. Ce colorant, combiné au SYBr, améliore la visibilité du gène présent dans l'échantillon.

Ainsi, le premier puits du gel a reçu 5 µl de solution de 100 paires de bases (marqueur de poids moléculaire servant de repère de lecture) à laquelle le colorant (bleu de bromophénol) était ajouté. Les puits suivants ont reçu chacun, 15 µl du produit de la PCR (les derniers puits étant réservés aux contrôles positifs). Nous avons fait migrer les échantillons d'ADN sous un voltage

constant de 98 V pendant 30 à 40 mn et l'acquisition des images s'est faite au moyen du logiciel *Fusion-X*®. L'évaluation de la présence du gène s'est faite quant à elle en se basant sur la présence d'une bande correspondant au poids moléculaire du gène attendu : un échantillon est positif lorsqu'il présente une bande blanche située sur la même ligne horizontale que celle du contrôle positif (celui-ci est identifié selon son poids moléculaire grâce au marqueur de poids moléculaire) (**Figure 3**).



Verticalement : ligne M : Marqueur de poids moléculaire; lignes 1, 6 et 16 : échantillons positifs à *iucD*; ligne 3 : échantillon positif à la fois à *iucD* et *cnf*; lignes 7, 8 et 13 : échantillons positifs à la fois à *iucD* et *tsh*, ligne A : contrôle positif ECL17088; ligne B : contrôle positif ECL13421.

**Figure 3 :** Profil de migration des gènes des ExPEC sur gel d'agarose.

### I.2.3 Analyses statistiques

Les données ont été saisies avec le logiciel *Epidata*® [version 3.1] puis exportées sur une feuille du tableur *Excel* de *Microsoft office 2007*. Le logiciel *R commander*® [version 2.10.0] a servi pour l'analyse statistique de ces données. Les fréquences des différentes variables qualitatives ont été déterminées et comparées en utilisant le test de  $\chi^2$  et le test exact de Fischer en fixant le seuil de significativité à 5%. Par ailleurs, des odds ratio et des intervalles de confiance ont été déterminés par le logiciel *Winepiscope*® [version 2.0] afin de vérifier l'association entre le port des gènes de résistance aux antibiotiques et la résistance phénotypique. Il y a association entre la résistance phénotypique et le port d'un gène lorsque  $OR > 1$  et cette association est forte si la borne inférieure de l' $IC_{95\%}$  est supérieure à 1.

Les résultats analysés ainsi que leur discussion sont présentés dans le chapitre suivant.

## Chapitre II : Résultats et discussion

### II.1 Résultats

#### II.1.1 Résultats de terrain

Tous les 32 éleveurs enquêtés ont déclaré avoir désinfecté leurs bâtiments d'élevage avant l'arrivée des poussins. Parmi eux, 29 (91%) ont fait un vide sanitaire de deux semaines. Sur le plan pathologique, 12 (38%) élevages ont connu divers problèmes de santé depuis le démarrage dont 3 (25%) ont mis en place des traitements antibiotiques. Les antibiotiques utilisés étaient la norfloxacine et l'oxytétracycline. La présence d'autres animaux domestiques a été observée dans 16 (50%) des fermes et 21 (66%) des 32 élevages avaient une hygiène défectueuse caractérisée par une humidité marquée de la litière. Par ailleurs, nous avons constaté que seulement 10 (31%) des éleveurs enquêtés ont recours aux services d'un vétérinaire ou d'un laboratoire de diagnostic lorsqu'un problème de santé survient dans leur ferme.

#### II.1.2 Résultats de laboratoire

Les souches d'*E. coli* ont été isolées sur 100% des échantillons collectés. Ces *E. coli* ont subi diverses analyses dont les résultats sont présentés ci-dessous.

##### II.1.2.1 Antibiogramme

Un total de 173 isolats a fait l'objet d'un test de sensibilité à 15 antibiotiques. Ces isolats se répartissent comme suit : 50 isolats sont obtenus à partir des échantillons d'eau d'abreuvement, 91 proviennent des échantillons de fèces, 12 des eaux d'abattage et 20 sont issus des écouvillons de carcasses. La résistance a été observée, avec des niveaux variables, pour tous les 15 antibiotiques. Les taux de résistance diffèrent significativement ( $p < 0,05$ ) entre les différents antibiotiques et selon les types d'échantillons (**Tableau VI**). Pour l'ensemble des 173 isolats testés, les taux de résistance les plus élevés ont été obtenus pour les tétracyclines (94%), le sulfisoxazole (90%) et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (85%) alors que les plus faibles niveaux ont été enregistrés pour l'amikacine (0,6%) et l'amoxicilline (2%), suivis du ceftriaxone, de la cefoxitine, et de la gentamycine qui ont chacun, 3% de taux de résistance. Il faut souligner le taux de résistance assez élevé, obtenu pour le chloramphénicol (24%, une molécule proscrite pour ses effets aplasiques) et pour les quinolones (ciprofloxacine (23%) et acide nalidixique (41%)), des molécules très utilisées en traitement de pointe des infections urinaires. L'ampicilline (49%) a le plus haut niveau de résistance parmi les bêta-lactamines tandis que la streptomycine (59%) et le sulfisoxazole (90%) ont les plus hauts niveaux de résistance respectivement pour les familles des aminoglycosides et des sulfonamides. Enfin, la majorité (94%) des isolats sont résistants à au moins 2 antibiotiques; la multirésistance pouvant intéresser jusqu'à 14 antibiotiques et les multirésistances à 4 antibiotiques sont les plus fréquemment observées (31%).

**Tableau VI:** Nombre (pourcentage) d'isolats d'*E. coli* résistants aux différents antibiotiques selon les types d'échantillons.

Familles d'ATB	ATB	E. ABRV (n=50)	FECES (n=91)	E. ABAT (n=12)	ECOUV (n=20)	Total (n=173)
AMINOGLY- COSDES	AN	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (0,6%)
	GM	4 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	5 (3%)
	K	10 (20%)	18 (20%)	1 (8%)	4 (20%)	33 (19%)
	S	27 (54%)	56 (62%)	7 (58%)	12 (60%)	102 (59%)
BETA- LACTAMINES	AMC	0 (0%)	1 (1,1%)	0 (0%)	2 (10%)	3 (2%)
	AM	19 (38%)	46 (51%)	8 (67%)	11 (55%)	84 (49%)
	FOX	0 (0%)	4 (4,4%)	0 (0%)	1 (5%)	5 (3%)
	XNL	0 (0%)	4 (4,4%)	0 (0%)	1 (5%)	5 (3%)
	CRO	1 (2%)	3 (3,3%)	0 (0%)	1 (5%)	5 (3%)
QUINO- LONES	NA	15 (30%)	40 (44%)	5 (42%)	11 (55%)	71 (41%)
	CIP	7 (14%)	22 (24%)	4 (33,33%)	7 (35%)	40 (23%)
PHENIC.	C	11 (22%)	19 (21%)	2 (17%)	9 (45%)	41 (24%)
SULFO- NAMIDES	G	43 (86%)	80 (88%)	12 (100%)	20 (100%)	155 (90%)
	SXT	43 (86%)	78 (86%)	12 (100%)	14 (70%)	147 (85%)
TETRA.	TE	45 (90%)	87 (96%)	12 (100%)	19 (95%)	163 (94%)

ATB : Antibiotiques; E. ABRV : eau d'abreuvement; E.ABAT : eau d'abattage; ECOUV : écouvillon de carcasses; PHENIC. : Phénicolé; TETRA. : Tétracyclines, n : nombre d'isolats testés.

### II.1.2.2 Gènes de résistance aux antibiotiques

Sur les 25 isolats testés, 20 (80%) sont porteurs d'au moins un gène. Le gène *bla<sub>TEM</sub>* codant pour la résistance à l'ampicilline est le plus prévalent (72%) avec une forte association à la résistance phénotypique, suivi de la prévalence des gènes *qnrB* (24%) et *bla<sub>SHV</sub>* (12%) (**Tableau VII**). Les gènes *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *qnrA* et *aac(6)* n'ont été trouvés dans aucun isolat. Parmi les isolats positifs, 8 (32%) sont porteurs d'au moins 2 gènes à la fois et les combinaisons des gènes au sein de ces 8 isolats se répartissent comme suit : *bla<sub>TEM</sub>-qnrB* (20%); *bla<sub>TEM</sub>-qnrB-bla<sub>SHV</sub>* (4%); *bla<sub>TEM</sub>-qnrS* (4%) et *bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>SHV</sub>* (4%).



**Tableau VII :** Prévalences des gènes de résistance aux antibiotiques.

Antibiotiques	Gènes	Isolats testés	Positifs (%)	Positifs et résistants	Positifs et sensibles	Négatifs et résistants	Négatifs et sensibles	OR	IC <sub>95%</sub>
Ampicilline	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	25	18 (72%)	17	1	4	3	12,5	[1,03 ; 57]*
	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	25	3 (12%)	3	0	18	4	7,02	[0,012 ; 175]
	<i>bla<sub>OXA</sub></i>	25	0 (0%)	0	0	21	4	-	-
Ciprofloxacine	<i>qnrA</i>	25	0 (0%)	0	0	11	14	-	-
	<i>qnrB</i>	25	6 (24%)	3	3	8	11	1,37	[0,21 ; 8,67]
	<i>qnrS</i>	25	1 (4%)	1	0	10	14	15,36	[0,02 ; 10460]
	<i>Aac (6)</i>	25	0 (0%)	0	0	11	14	-	-
Acide nalidixique	<i>qnrA</i>	25	0 (0%)	0	0	14	11	-	-
	<i>qnrB</i>	25	6 (24%)	3	3	11	8	0,7	[0,11 ; 4,58]
	<i>qnrS</i>	25	1 (4%)	1	0	13	11	9,32	[0,01 ; 6343]
	<i>Aac (6)</i>	25	0 (0%)	0	0	14	11	-	-
Ceftiofur	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	25	0 (0%)	0	0	2	23	-	-
Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M15</sub></i>	25	1 (4%)	1	0	1	23	231	[0,27 ; 19740]

OR : odd ratio; IC<sub>95%</sub> : intervalle de confiance à 95%; \* : forte association entre le port du gène et la résistance phénotypique.

### II.1.2.3 Prévalence des gènes de virulence des ExPEC et des STEC

Sur 118 échantillons testés, 83 (70,33%) se sont révélés positifs parmi lesquels 76 échantillons sont porteurs d'au moins un gène de virulence des ExPEC, un échantillon est positif à un gène de virulence des STEC et 6 échantillons combinent à la fois les gènes de virulence des ExPEC et des STEC. Tous les quatre gènes de virulence des ExPEC recherchés ont été détectés alors que seulement deux gènes de virulence des STEC l'ont été (**Tableau VIII**).

**Tableau VIII** : Prévalences des gènes de virulence dans les échantillons testés par PCR multiplexes.

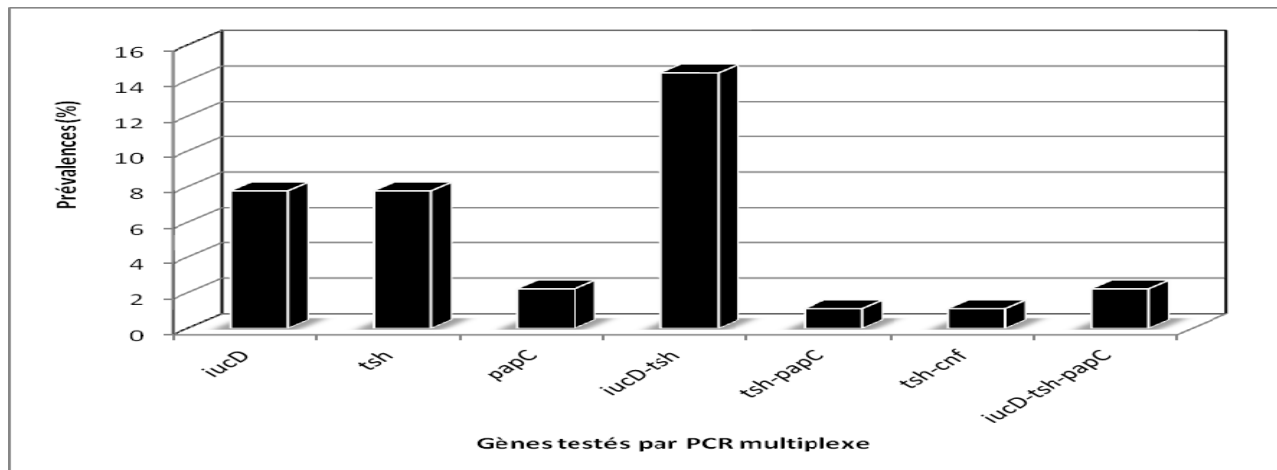
Echantillons (nombre)	ExPEC (%)				STEC (%)		
	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>papC</i>	<i>cnf</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
Eau d'abreuvoir (50)	46	32	32	2	0	4	0
Fèces (50)	76	64	36	10	6	4	0
Eau d'abattage (8)	50	37,5	37,5	12,5	0	0	0
Écouvillons (10)	80	80	20	10	0	0	0
Différence statistique	DS*	DS*	DS	DS	DS	DS	NS
Total (118)	62	50	33	6,8	3	3,4	0

DS\* : différence très significative ( $p < 0,001$ ); DS : différence significative ( $p < 0,05$ ); NS : Différence non significative ( $p > 0,05$ ).

Les prévalences des différents gènes diffèrent significativement entre elles et selon le type de prélèvement ( $p < 0,05$ ). Globalement, les échantillons de fèces ont montré une plus forte prévalence des gènes des deux pathotypes. Aussi, faut-il signaler l'absence des gènes de virulence des STEC dans les échantillons d'eau d'abattage et dans les écouvillons des carcasses.

### II.1.2.4 Prévalence des virotypes des ExPEC dans les isolats

Au total, 90 isolats ont été testés pour la recherche des virotypes des ExPEC. Seulement 33 (36,66%) avaient un virotype contre 57 (63,34%) qui n'en avaient pas. Parmi les virotypes présents dans les isolats, le virotype *iucD-tsh* (14,44%) est le plus fréquemment observé, suivi des virotypes *iucD* (7,77%) et *tsh* (7,77%). Les virotypes *tsh-papC* (1,11%) et *tsh-cnf* (1,11%) sont les moins prévalents (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Fréquences des virotypes des ExPEC testés par PCR multiplexe.

## II.2 Discussion

### II.2.1 Discussion de la méthodologie

#### ➤ Echantillonnage

La méthode d'échantillonnage à deux degrés a été à la base de la constitution de notre échantillon de fermes. La taille de l'échantillon (32 fermes) que nous avons étudiée est représentative du total de fermes (68) qui existaient dans la zone d'étude durant notre séjour sur le terrain. Cependant, il faut souligner le faible nombre d'échantillons d'eau d'abattage et d'écouvillons de carcasses par rapport aux échantillons de fèces et d'eau d'abreuvement. Ceci est dû au fait que très peu d'abattages ont eu lieu durant notre période d'étude ; les abattages étant étroitement liés à la demande qui est plus élevée pendant les périodes de grandes fêtes religieuses et de fin d'année. Toutefois, les tailles des échantillons que nous avons étudiés sont comparables à celles examinées par la plupart des auteurs qui ont mené le même type d'étude. C'est le cas des 31 isolats examinés par **Maturana et al. (2011)** au Brésil et 197 isolats par **Bonnet et al. (2009)** au Canada pour les gènes de virulence des ExPEC, des 54 et 422 isolats examinés respectivement par **NDiaye (2010)** au Sénégal et **Johnson et al. (2011)** aux USA pour l'antibiorésistance et enfin, des 22 et 388 isolats examinés pour les gènes d'antibiorésistance par **Brinas et al. (2002)** en Espagne et **Randall et al. (2011)** en Angleterre respectivement.

#### ➤ Choix des échantillons

Les échantillons de fèces ont été choisis en raison du rôle que les matières fécales des volailles jouent dans la contamination de l'environnement et de l'Homme par les *E. coli* aviaires. En effet, bien que les *E. coli* fassent partie de la flore normale des volailles, on estime qu'environ 10 à 15% de ces colibacilles commensaux peuvent devenir pathogènes à la faveur de l'acquisition de facteurs de virulence (**Villate, 2001**). A ce titre, les matières fécales des volailles constituent le meilleur indice pour évaluer le portage des *E.*

*coli* pathogènes par les volailles apparemment saines. Les échantillons d'eau d'abreuvement, d'eau de lavage des carcasses et les écouvillons de carcasses ont été prélevés pour évaluer le niveau d'hygiène dans les élevages et lors des abattages, à travers la contamination fécale.

### ➤ **Analyses de laboratoire**

Les analyses de laboratoire ont toutes été effectuées selon des techniques standardisées. Les échantillons récoltés dans les fermes avicoles ont été traités au laboratoire de microbiologie de l'EISMV de Dakar en respectant la procédure ECL-PROC-062 du laboratoire de référence de l'OIE pour *E. coli*. Les réactions PCR pour la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes de virulence et des virotypes ont été faites selon la procédure ECL-PON-002 du même laboratoire EcL. Ces PCR ont été réalisées en employant des souches de contrôle positives mises au point par ledit laboratoire. Les gènes de résistance aux antibiotiques sont choisis en raison de leur localisation plasmidique (donc facilement transmissibles). Quant aux pathotypes ExPEC et STEC, ils ont été choisis pour leur importance économique et/ou hygiénique: les ExPEC sont le groupe auquel appartiennent les APEC (souches d'*E. coli* responsables de la colibacillose aviaire) et les STEC sont les pathotypes les plus virulents pour les humains et pour lesquels, les volailles peuvent être des hôtes réservoirs.

Quant aux tests d'antibiogramme, ils ont été effectués suivant la procédure ECL-PROC-055 du laboratoire EcL, calquée sur les normes du CLSI. Le caractère lactose positif (premier critère de pathogénicité des *E. coli*) et les tests biochimiques ont guidé le choix des isolats. Cette démarche nous a permis d'obtenir des isolats appartenant effectivement à l'espèce *E. coli* puisque ces tests sont fiables, surtout le test d'indole qui permet d'identifier 99% des *E. coli* (Cross, 1994 cité par Mellata, 2003). Les 15 antibiotiques sont choisis, à l'exception du chloramphénicol, en raison leur importance: ils sont soit couramment utilisés en médecine humaine et/ou vétérinaire (ampicilline, acide nalidixique, ciprofloxacine, etc.), soit utilisés uniquement en cas d'échec thérapeutique (ceftriaxone, cefoxitine et ceftiofur). Quant au chloramphénicol, molécule dont l'utilisation est interdite en médecine, il a été choisi pour vérifier s'il continue d'être utilisé sur le terrain.

## **II.2.2 Discussion des résultats**

### ➤ **Résultats de terrain**

Nous-nous sommes rendus compte lors de l'enquête de terrain que les éleveurs pratiquent le vide sanitaire dans leur grande majorité (91%). Mais les mesures effectives d'hygiène ne sont prises, pour la plupart des élevages, qu'à cette étape car nous avons constaté que 66% des fermes visitées avaient une hygiène très défectueuse, caractérisée par l'humidité de la litière. Or il est établi que l'humidité de la litière est à l'origine de l'éclosion dans les fermes avicoles de nombreuses pathologies dont la colibacillose (Villate, 2001). Seulement 31%

d'éleveurs font recours aux services d'un vétérinaire ; ce qui explique en partie le non-respect des règles d'hygiène.

### ➤ **Résultats de laboratoire**

#### • **Antibiogramme**

La résistance a été observée vis-à-vis de tous les 15 antibiotiques. Les antibiotiques qui ont enregistré les plus de résistance sont les tétracyclines (94%), le sulfisoxazole (90%) et le triméthoprim-sulfaméthoxazole (85%) tandis que l'amikacine (0,6%), l'amoxicilline (2%), le ceftriaxone (3%), la céfoxitine (3%), le ceftiofur (3%) et la gentamicine (3%) ont présenté les plus bas niveaux de résistance.

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par de nombreux auteurs dont les études ont porté sur les mêmes antibiotiques. Au Sénégal, certaines études (**Fofana et al., 2004; Diouf, 2006** et **NDiaye, 2010**) ont déjà rapporté des profils de résistance conformes aux résultats que nous avons obtenus pour les tétracyclines, la streptomycine, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, la gentamicine, le ciprofloxacine et la céfoxitine. Nos résultats suivent le même ordre que celui de **Yang et al. (2004)** en Chine mais à des taux plus bas que ceux qu'ils ont obtenus pour les tétracyclines (100%) et la gentamicine (30%). Les études du **PICRA (2009)** au Canada et de **Johnson et al., (2011)** aux U.S.A, rapportent également des tendances similaires, mais dans des proportions plus faibles que les nôtres, aux tétracyclines (43,85% et 49,10% respectivement) et à la streptomycine (45,02% et 44,5% respectivement) et plus basses à l'amikacine (0%). Ces différences seraient liées à la fréquence d'utilisation, selon les pays, de ces antibiotiques pour traiter ou prévenir certaines affections. Au Sénégal par exemple, les antibiotiques tels que les tétracyclines, les sulfonamides et la streptomycine sont les plus employés en chimioprévention dans les exploitations avicoles (**NDiaye, 2010**) et dans le traitement des diarrhées infantiles (**Diouf, 2006**). Il convient de signaler la résistance assez élevée (24%), identique à celle rapportée par **Yang et al. (2004)** en Chine, au chloramphénicol, un antibiotique interdit d'utilisation car il peut provoquer une aplasie médullaire irréversible. Cette résistance signifie que cet antibiotique est encore utilisé par les éleveurs.

La résistance aux 15 antibiotiques a été observée pour tous les 4 types d'échantillons que nous avons récoltés. Bien que le nombre d'échantillons d'eau d'abattage et d'écouvillons de carcasses soient faibles, ils ont présenté pour certains antibiotiques, en l'occurrence les tétracyclines, le sulfisoxazole et le triméthoprim-sulfaméthoxazole, des taux de résistance comparables à ceux des échantillons de fèces et d'eau d'abreuvement. Ceci signifierait que le lavage des carcasses par les éleveurs lors d'abattage contribue à leur contamination croisée.

#### • **Fréquences des gènes de virulence**

Nos résultats ont montré que les gènes des ExPEC et des STEC circulent dans les élevages avicoles de la zone périurbaine de Dakar. Tous les gènes des ExPEC testés ont été trouvés avec des prévalences relativement élevées pour les gènes *iucD* (62%), *tsh* (50%) et *papC* (33%) par rapport au gène *cnf* pour lequel une prévalence de 6,8% a été notée. Les études effectuées par de nombreux auteurs sur les volailles ont déjà fait état de cet ordre de prévalence des gènes des ExPEC. C'est notamment le cas des études de **Cortés et al. (2010)** en Espagne qui ont rapporté des prévalences de 43,9% (*iucD*), 21,1% (*tsh*), 14% (*papC*) et 0% (*cnf*) et de **Bonnet et al. (2009)** au Canada qui ont pour leur part, rapporté des prévalences de 12,2% (*iucD*), 11,2% (*tsh*) et 0% (*papC*). Ces derniers n'ont cependant pas recherché le gène *cnf*. Dans le même ordre, **Kylie et al. (2005)** rapportent aux USA, des prévalences de 41,3%, 9,6% et 1% pour les gènes *tsh*, *papC* et *cnf* respectivement. Les fréquences relativement plus élevées que nous avons obtenues pourraient être dues au manque d'hygiène que nous avons constaté lors de notre enquête de terrain. Pour ce qui concerne les gènes des STEC, nos résultats ont montré, comme on pouvait s'y attendre puisqu'il ne s'agit pas de pathotypes habituellement rencontrés chez les volailles, des taux plus faibles et seuls les gènes *eae* (3%) et *stx1* (3,4%) ont été découverts dans les échantillons. La prévalence du gène *eae* (3%) est comparable à celle de 2,4%, obtenue par **Lee et al. (2009)** en Corée du Sud. Ces STEC pourraient provenir de l'Homme ou des autres espèces animales.

Selon le type d'échantillons examinés, les gènes des ExPEC ont été découverts dans tous les échantillons, contrairement aux gènes des STEC qui n'étaient détectés que dans les matières fécales (*eae* et *stx1*) et dans l'eau d'abreuvement (*stx1*) dont la contamination pourrait être d'origine fécale. La présence des gènes des STEC dans les matières fécales corrobore les assertions de **Beery et al. (1985)** cités par l'**AFSSA (2003)** et de **Fairbrother et Nadeau (2006)** selon lesquelles, les volailles peuvent être des hôtes réservoirs des STEC. Il y a donc des raisons de craindre des risques de zoonose liés à la présence d'une part, des gènes des ExPEC (car ils partagent les mêmes facteurs de virulence avec les ExPEC humains selon **Bauchart et al. (2010)** et **Kabir (2010)**) et d'autre part, des gènes des STEC chez des poulets cliniquement sains.

- **Prévalence des virotypes des ExPEC**

Sur 90 isolats testés, 33 (36,66%) ont porté au moins un gène de virulence des ExPEC. Les virotypes les plus observés sont ceux qui associent les gènes *iucD* et *tsh* (*iucD-tsh* (14,44%)), suivis des virotypes monogènes *iucD* (7,77%) et *tsh* (7,77%). Cela confirme les résultats que nous avons obtenus pour les gènes de virulence qui ont montré une prévalence plus élevée des gènes *iucD* et *tsh* dans les échantillons. L'association au sein d'un même isolat de 2 ou plusieurs gènes pourrait signifier que ces gènes sont portés par un même plasmide. Par ailleurs, le plus grand nombre d'isolats non-virotypables (63,34%) peut être expliqué par le fait que les échantillons proviennent d'élevages sains et que nous n'avons examiné que certains gènes de virulence. Nous n'avons en effet testé que le

variant D du gène *iuc* qui comprend 5 variants (Mainil, 2003) et le variant C du gène *pap* qui en compte 11 (Mellata, 2003).

- **Prévalences des gènes de résistance aux antibiotiques**

Les gènes d'antibiorésistance mis en évidence après avoir testé 25 isolats sont : *bla<sub>TEM</sub>* (72%), *qnrB* (24%), *bla<sub>SHV</sub>* (12%), *bla<sub>CTX-M15</sub>* (4%) et *qnrS* (4%). Le résultat que nous avons obtenu pour le gène *bla<sub>TEM</sub>* est similaire à celui obtenu en Espagne par Brinas et al. (2002) qui rapportent une prévalence de 77,3%. Pour les gènes *bla<sub>SHV</sub>* et *bla<sub>OXA</sub>*, ces auteurs rapportent des prévalences respectives de 0% et 4,54%. Nos résultats diffèrent de ceux de Randall et al. (2011) en Angleterre qui rapportent que le gène *bla<sub>CTX-M</sub>* (54,5%) est le plus prévalent et de Cortés et al. (2010) qui font état en Espagne des prévalences de 17,5% (*bla<sub>CMY-2</sub>*), 8,8% (*bla<sub>SHV</sub>*) et 3,5% (*bla<sub>TEM</sub>*). Ces disparités pourraient être dues à la fréquence d'emploi des divers antibiotiques qui varie selon les pays.

Une très bonne relation a été établie entre la présence du gène *bla<sub>TEM</sub>* dans les isolats et la résistance de ceux-ci à l'ampicilline. Cela n'a pas été le cas pour les autres antibiotiques et nous pensons que cette relation aurait pu être obtenue si un grand nombre d'isolats avait été examiné. Quant aux isolats qui ont manifesté une résistance phénotypique aux antibiotiques et dans lesquels les gènes ciblés n'ont pas été découverts, il est probable que cette résistance soit codée par des gènes que nous n'avons pas recherchés dans cette étude.

### II.3 Recommandations

Au vu des différents résultats que nous avons obtenus dans la présente étude et du fait qu'il n'y a qu'une santé (concept «One Health»), nous formulons les recommandations suivantes à l'endroit :

- des pouvoirs publics : sensibiliser et former les aviculteurs sur les risques liés au manque d'hygiène et au danger de l'utilisation incontrôlée des antibiotiques. Aussi, faut-il mettre en place un réseau de surveillance de l'antibiorésistance, à l'image du PICRA au Canada pour un contrôle plus efficace de ce phénomène ;
- des éleveurs : promouvoir l'hygiène dans les élevages afin de rentabiliser les productions et mettre à la disposition des consommateurs, des denrées exemptes de tout risque zoonotique ;
- des chercheurs : axer les recherches sur les maladies zoonotiques avec des méthodes de pointe permettant de cerner les dangers qui guettent les populations et contribuer à l'accroissement des productions animales;
- des professionnels de la santé animale et de la santé humaine : renforcer la collaboration en vue d'une synergie d'action dans le contrôle des résistances aux antibiotiques et des zoonoses comme les colibacilloses.

## Conclusion et perspectives

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont responsables d'importantes pertes économiques en aviculture, en plus d'être potentiellement zoonotiques. L'importance de ces bactéries est également liée à l'émergence des résistances aux antibiotiques.

Au Sénégal, il n'y a pas encore eu d'études portant sur la caractérisation génétique des *E. coli* aviaires, permettant de connaître les prévalences des gènes de virulence et d'antibiorésistance. Notre étude a donc consisté d'une part, à déterminer la prévalence de résistance de ces bactéries à 15 antibiotiques et d'autre part, à déterminer les prévalences des gènes de virulence, des virotypes et des gènes d'antibiorésistance.

Les résultats de l'antibiogramme ont montré, après examen de 173 isolats, une résistance des *E. coli* à tous les 15 antibiotiques. Parmi ces antibiotiques, la tétracycline (94%), le sulfisoxazole (90%) et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (85%) ont eu les niveaux de résistance les plus élevés. En outre, les PCR uniplexes effectuées pour détecter les gènes d'antibiorésistance ont révélé l'existence dans les isolats des gènes de résistance, plus particulièrement ceux codant pour la résistance à l'ampicilline et aux quinolones.

Les PCR multiplexes effectuées sur 118 cultures primaires d'*E. coli* pour tester les gènes de virulence des ExPEC et des STEC ont révélé une présence significativement élevée des gènes de virulence des ExPEC (*iucD* : 62% ; *tsh* : 50% ; *papC* : 33% et *cnf* : 6,8%) par rapport aux gènes de virulence des STEC (*eae* : 3% ; *stx1* : 3,4% et *stx2* : 0%). Par ailleurs, des PCR multiplexes effectuées sur 90 isolats ont montré une prédominance des virotypes impliquant les gènes *iucD* et/ou *tsh* (*iucD-tsh* : 14,44%; *iucD* : 7,77% et *tsh* : 7,77%) par rapport aux autres virotypes (*tsh-papC* : 1,11% et *tsh-cnf* : 1,11%).

Au vu de ces résultats, il apparaît que les souches d'*E. coli* isolées de poulets cliniquement sains constituent une potentielle source de zoonose, de développement de la colibacillose aviaire et de dissémination de la résistance aux antibiotiques. De ce fait, des mesures rigoureuses d'hygiène et une utilisation plus rationnelle des antibiotiques dans les élevages sont à promouvoir, à travers la sensibilisation des populations et surtout des aviculteurs, afin de limiter les risques zoonotiques et les pertes économiques dues à la maladie et à l'émergence des résistances.

En sus de ces mesures d'hygiène, des recherches complémentaires méritent d'être conduites afin de caractériser davantage les *E. coli* aviaires. Ces études pourraient consister à séquencer les souches afin de connaître les groupes phylogénétiques des *E. coli* qui sévissent dans les fermes avicoles du Sénégal.



## Références bibliographiques

1. AFSSA, 2003- Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de shiga toxines (STEC). – Paris : AFSSA. - 220p
2. Bauchart P., Germon P., Bree A., Oswald E., Hacker J. et Dobrindt U., 2010- Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* - Search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microbial Pathogenesis*, **49** (2010) : 105-115
3. Brinas L., Zarazaga M., Saenz Y., Ruiz-Larrea F. et Torres C., 2002-  $\beta$ -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans and healthy animals. *Antimicrob. Agents and chemother.*, **46** (10) : 3156-3163
4. Bonnet C., Diarrassouba F., Brousseau R., Masson L., Topp E. et Diarra M. S., 2009- Pathotype and antibiotic resistance gene distribution of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Applied and Environn. Microbiol.*, **75** (22) : 6955-6962
5. Cortés P., Blanc V., Mora A., Dahbi G., Blanco J. E., Blanco M., Lopez C., Andreu A., Navaro F., Alonso M. P., Bou G., Blanco J. et Llagostera M., 2010- Isolation and characterisation of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Am. Soc. for Microbiol.*, **9** (76) : 2799-2805
6. Dho-Moulin M. et Fairbrother J. M., 1999- Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vét. Res.*, **30** (2-3) : 299-316
7. Diouf K. C. N., 2006- Surveillance de la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella spp.* et d'*Escherichia coli* isolées de la viande de poulets de chair au Sénégal. Mém : Dakar (EISMV)
8. F.A.O, 2005- Sénégal: Livestock sector in brief. -Rome : FAO, 20p
9. Fairbrother J. M. et Nadeau E., 2006- *Escherichia coli*: on farm contamination of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **25** (2) : 555-569
10. Farooq S., Hussain I., Mir M. A., Bhat M. A. et Wani S. A., 2009- Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and shiga toxin 1 and 2 f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *The Soc. For Applied Microbiol.* **48** : 692-697
11. Fofana A., Bada-Alambédji R., Seydi M. et Akakpo A. J., 2006- Résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées de la viande de poulet de chair au Sénégal. *Dakar médical*, **51** (3) : 145-150
12. Guillot J. F., 1990- Bases moléculaires et épidémiologiques de l'antibiorésistance bactérienne. *Ann. Rech. Vét.*, **21** : 1-11

13. Johnson T. J., Logue C. M. Johnson J. R., Kuskowski M. A., Sherwood J. S., Barnes H. J., Debroy C., Wannemuehler Y. M., Obata-Yasuoka M., Spanjaard L. et Nolan L. K., 2011- Associations between multidrug resistance, plasmid content and virulence potential among Extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne pathogens and Dis.*, **00** (00) : 2011
14. Kabir L. S.M., 2010- Avian colibacillosis and salmonellosis : a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environn. Res. and Public Health*, **7** : 89-114
15. Kern-Benaibout E. M., 2006- *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme : synthèse sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'Homme par la contamination de l'environnement. Thèse : Ecole Nat. Vét. Toulouse : 3
16. Kylie R-S., Giddings W. C., Doetkott C., Johnson T. J. et Nolan L. K., 2005- Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* **36** : 241-256
17. Lee G. Y., Jang I., Hwang I. G. et Rhee M. S., 2009- Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry and pork in Korea. *Int. J. of Food Microbiol.*, **134** : 196-200
18. Li L., Jiang Z.-G., Xia L.-N., Shen J.-Z., Dai L., Wang Y., Huang S.-Y. et Wu C.-M., 2010- Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970–2007. *Vet. Microbiol.*, **144** : 505-510
19. Liut B.-T., Wang X.-M., Liao X.-P., Sun J., Zhu H.-Q., Chen X.-Y. et Liu Y.-H., 2011- Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *oqxAB* and *aac(6')-Ib-Cr* and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>CTX-M-24</sub>* co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* isolate strain from China. *J. of Antimicrob. Chemother.*, **66** : 1638-1658
20. Mainil J., 2003- Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Méd. Vét.*, **147** : 159-171
21. Mainil J., et Van Bost S., 2004- Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : souches nécrotogènes. *Ann. Méd. Vét.*, **148** : 121-132
22. Mellata M., 2003- Rôle des facteurs de virulence des *E. coli* pathogènes aviaires dans la colibacillose. Thèse (PhD) : Univ. Montréal, 2
23. Nagy B. et Fekete P. Z., 1999- Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vét. Res.*, **30** : 259-284
24. NDiaye C., 2010- Etude anatomo-pathologique et bactériologique sur des cas suspects de colibacillose aviaire dans les régions de Dakar et de Thiès (Sénégal). Thèse : Méd. Vét : Dakar; 9

25. O.M.S., 2000- Problèmes liés à l'usage des antimicrobiens dans les exploitations agricoles. *Le Point* : 28-29
26. Randall L., Wu G., Neils P., Coldham N., Mevius D. et Teale C., 2011- Virulence genes in *bla<sub>CTX-M</sub>* *Escherichia coli* isolates from chickens and humans. *Res. Vet. Sci.*, doi : 10.1016/j.rvsc.2011.06.016
27. Robineau B. et Moalic P.-Y., 2010- Une maladie d'actualité en production aviaire : la colibacillose. *Bull. Acad. Vét. France*, (163) : 3
28. Smet A., Nieuwerburgh F. N., Vandekerckhove T. T. M., Martel A., Deforce D., Butaye P. et Haesebrouck F., 2010- Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates : insertional events of transposons and insertion sequence. *Plos One*, 5 (6) : e11202
29. Stordeur P. et Mainil J., 2002- La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.*, 146 : 11-18
30. Villate D., 2001- Manuel pratique : maladies des volailles. –Paris : France Agricole, 2<sup>ème</sup> Ed., 399p
31. Wales A. D., Woodward M. J. et Pearson G. R., 2005- Attaching-effacing bacteria in animals. *J. of Comp. Pathol.*, 132 (1) : 1-26
32. Yang H., Chen S., White D. G., Zhao S., McDermott. Walker R. et Meng J., 2004- Characterisation of multiple antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. of clinical Microbiol.*, 42 (8) : 3483-3489
33. Zhao L. Gao S. Huan H., Xu X., Zhu X., Yang W., Gao Q. et Liu X., 2009- Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *Escherichia coli* in a murine urinary tract infection model and chicken challenge model. *Microbiol.* : 155 : 1634-1644.

**Webographie :**

34. EcL, 2011- Classification des *Escherichia coli* pathogènes. [En ligne]. Accès internet : <http://www.ecl-lab.com> (consulté le 29/07/2011)
35. Miles T. D., McLaughlin W. et Brown P. D., 2006- Antimicrobial resistance of *E. coli* from broiler chickens and humans. [En ligne]. Accès internet : <http://www.biomedcentral.com> (consulté le 25/10/2011)
36. PICRA, 2009- Résistance aux antimicrobiens observée parmi les isolats d'*Escherichia coli* provenant de poulets : surveillance en abattoir. [En ligne]. Accès internet : <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2009/1> (consulté le 16/11/2011).

## ANNEXE

**Annexe I** : Liste des PCR effectuées, des master-mix préparés et des cycles de températures correspondants.

PCR	Mater-mix (solutions mères)	Cycles de températures
Gènes de virulence des ExPEC (idem virotypes ExPEC)	Tampon MgCl <sub>2</sub> (75µl), dNTP (75µL), <i>papC</i> for (37,5µl), <i>papC</i> rev (37,5µl), <i>cnf</i> for (37,5µl), <i>cnf</i> rev (37,7µl), <i>iucD</i> for (37,5µl), <i>iucD</i> rev (37,5µl), <i>tsh</i> for (37,5µl), <i>tsh</i> rev (37,5µl), eau stérile (144µl), Taq polymérase (6µl).	1) 94°C : 5mn; 2) 94°C : 30s; 3) 55°C : 30s; 4) 72°C : 30s; 5) Répéter 2 à 4, 24 fois; 6) 72°C : 5mn; 7) 4°C : jusqu'à la fin.
Gènes de virulence des STEC	MgCl <sub>2</sub> (75µl); dNTP (75µl); <i>eae</i> for (37,5µl); <i>eae</i> rev (37,5µl); <i>stx1</i> for (37,5µl); <i>stx1</i> rev (37,5µl); <i>stx2</i> for (37,5µl); <i>stx2</i> rev (37,5µl); eau stérile (219µl); Taq polymérase (6µl).	1) 94°C : 5mn; 2) 94°C : 30s; 3) 60°C : 30s; 4) 72°C : 30s; 5) Répéter 2 à 4, 24 fois; 6) 72°C : 5mn; 7) 4°C : jusqu'à la fin.
Gènes de résistance aux antibiotiques	Pour chaque gène, préparer un master-mix contenant : dNTP (75µL); MgCl <sub>2</sub> (75µl); amorce for (37,5µl); amorce rev (37,5µl); eau stérile (369µl) et Taq polymérase (6µl).	Même cycle pour les gènes <i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>CMY</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> et <i>bla<sub>TEM</sub></i> : 1) 95°C : 2mn ; 2) 94°C : 30s ; 3) 50°C : 30s ; 4) 72°C : 30s ; 5) Répéter 2 à 4, 29 fois ; 6) 72°C : 10mn et 7) 4°C : pour toujours.
		Pour le gène <i>bla<sub>OXA</sub></i> : 1) 94 °C : 2 mn; 2) 25 cycles de 94°C : 30s; 3) 50°C : 30s; 4) 72°C : 30s; 5) 4°C jusqu'à la fin.
		Pour les gènes <i>qnrB</i> et <i>qnrS</i> (même cycle) : 1) 94°C : 5mn; 2) 32 cycles de 94°C 45s; 3) 53°C : 45s; 4) 72°C : 60s; 5) 72°C : 5mn; 6) 4°C : jusqu'à la fin.
		Pour le gène <i>qnrA</i> : 1) 94°C : 5mn; 2) 94°C : 45mn; 3) 48°C : 45s; 4) 72°C : 5 mn; 5) Répéter 2 à 4, 31 fois; 6) 72°C : 5mn; 7) 4°C : jusqu'à la fin.
		Pour le gène <i>aac (6)</i> : 1) 94°C : 5mn; 2) 94°C : 45s; 3) 55°C : 45s; 4) 72°C : 45s; 5) Répéter 2 à 4, 33 fois; 6) 72°C : 2mn; 7) 4°C jusqu'à la fin.

Prévalence des gènes de virulence et d'antibiorésistance des *Escherichia coli* dans les fermes de poulets de chair de la zone péri-urbaine de Dakar (Sénégal)

Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes of *Escherichia coli* in broiler chicken farms around Dakar province (Sénégal)

### Résumé

Cette étude pionnière avait pour objectif de caractériser les souches d'*Escherichia coli* isolées des échantillons collectés dans 32 fermes de poulets de chair de la zone périurbaine de Dakar.

Un total de 118 échantillons a ainsi été criblé par PCR multiplexes pour la détermination de la prévalence des gènes de virulence des ExPEC et des STEC. Les résultats ont montré une prévalence significativement élevée des gènes de virulence des ExPEC (*iucD* : 62% ; *tsh* : 50% ; *papC* : 33% et *cnf* : 6,8%) comparativement à la prévalence des gènes de virulence des STEC (*eae* : 3% ; *stx1* : 3,4% et *stx2* : 0%). A partir de ces 118 souches, 173 isolats ont été sélectionnés après des tests biochimiques et soumis au test de sensibilité à 15 antibiotiques, en utilisant la méthode de diffusion en gélose. La résistance a intéressé tous les 15 antibiotiques et les plus hauts niveaux de résistance ont été enregistrés pour la tétracycline (94%), le sulfisoxazole (90%) et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (85%). Parmi ces 173 isolats, 90 ont été testés par PCR multiplexe pour la recherche des virotypes des ExPEC. Ce test a montré une forte prévalence des virotypes impliquant uniquement les gènes *iucD* et/ou *tsh* (*iucD-tsh* (14,44%), *iucD* (7,77%) et *tsh* (7,77%)) par rapport aux autres virotypes (*tsh-papC* (1,11%) et *tsh-cnf* (1,11%)). En fin, 25 isolats choisis parmi les 90 précédents ont été testés par PCR uniplexes pour la détection des gènes de résistance à l'ampicilline (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*), aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)*), au ceftriaxone (*bla<sub>CTX-M15</sub>*) et au ceftiofur (*bla<sub>CMY-2</sub>*). Une forte prévalence a été obtenue pour le gène *bla<sub>TEM</sub>* (72%) avec une association significative à la résistance phénotypique, suivie de la prévalence des gènes *qnrB* (24%) et *bla<sub>SHV</sub>* (12%). Aucun isolat n'était positif aux gènes *bla<sub>OXA</sub>*, *qnrA*, *aac(6)* et *bla<sub>CMY-2</sub>*.

Cette étude préliminaire mérite d'être complétée par une caractérisation phylogénique et génotypique afin de connaître les groupes phylogénétiques d'*Escherichia coli* présents au Sénégal.

**Mots clés** : *Escherichia coli* aviaires, gènes de virulence, gènes de résistance aux antibiotiques, ExPEC, STEC, Dakar.

### Abstract

This pioneer study aimed to characterize *Escherichia coli* strains isolated from samples collected in 32 farms of healthy broiler chickens around Dakar (Senegal).

A total of 118 *E. coli* samples were examined by multiplex PCR to determine the prevalence of ExPEC and STEC pathotypes virulence genes. The results showed a significantly high prevalence of ExPEC virulence genes (*iucD* : 62% ; *tsh* : 50% ; *papC* : 33% and *cnf* : 6,8%) compared to the prevalence of STEC virulence genes (*eae* : 3% ; *stx1* : 3,4% and *stx2* : 0%). From these 118 *E. coli* samples, 173 isolates were selected on the basis of biochemical tests and analysed for their susceptibilities to 15 antimicrobial agents, by using the disc diffusion method. The resistance were observed against all of the antimicrobials and among these antimicrobial agents, tetracycline (94%), sulfisoxazole (90%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (85%) showed a very high level of resistance. Among these 173 isolates, 90 were tested by uniplex PCR for their ExPEC virotypes. This PCR examination has showed a high prevalence of virotypes including *iucD* and/or *tsh* genes (*iucD-tsh* (14,44%), *iucD* (7,77%) and *tsh* (7,77%)) in comparison to the other virotypes (*tsh-papC* (1,11%) and *tsh-cnf* (1,11%)). At last, 25 isolates was selected and examined by uniplex PCR for the presence of resistance genes against ampicillin (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*), quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)*), ceftriaxone (*bla<sub>CTX-M15</sub>*) and ceftiofur (*bla<sub>CMY-2</sub>*). A high prevalence of *bla<sub>TEM</sub>* (72%) with significant association to phenotypical resistance to ampicillin was found, followed by *qnrB* (24%) and *bla<sub>SHV</sub>* (12%). No isolate was positive for *bla<sub>OXA</sub>*, *qnrA*, *aac(6)* or *bla<sub>CMY-2</sub>*.

The study should be continued by characterization of a greater number of samples in a large part of Sénégal. This study could be completed by the *E. coli* phylotyping and genotyping, order to ascertain precisely the phylogenetic groups of *E. coli* in Sénégal.

**Keywords** : Avian *Escherichia coli*, virulence genes, antimicrobial resistance genes, ExPEC, STEC, Dakar.

**AUTEUR/AUTHOR** : VOUNBA Passoret, E-mail : [younbapassoret@yahoo.fr](mailto:younbapassoret@yahoo.fr)

**AU/IN SENEGAL**: EISMV-Dakar, BP 5077. TEL: (00221) 77 418 99 98

**AU/IN TCHAD**: S/C MOUDINET Passoret, ESSO-TCHAD BP 694-N'Djaména. TEL: (00235) 6629 69 17.