

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES
DE DAKAR
(E.I.S.M.V)



ANNEE 2012

N° 3

**CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE DES
ESCHERICHIA COLI ISOLES DES CAS DE COLIBACILLOSES
AVIAIRES AU SENEGAL**

Présentée et soutenue publiquement le **22 Février 2012** à **15 heures** devant la Faculté de
Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar pour obtenir le Grade de

DOCTEUR EN MEDECINE VETERINAIRE

(DIPLOME D'ETAT)

Par :

SOUMAILA GARBA Amina

Née le 02 Septembre 1987 à Cocody (Côte d'Ivoire)

JURY

PRESIDENT:

M. Bernard Marcel DIOP

**Professeur à la faculté de Médecine
de Pharmacie et
d'Odontostomatologie de Dakar**

DIRECTEUR ET

RAPPORTEUR DE THESE: M^{me} Rianatou BADA ALAMBEDJI

Professeur à L'EISMV de Dakar

MEMBRES :

M. Germain Jérôme SAWADOGO

Professeur à l'EISMV de Dakar

**M. Yaghouba KANE
(Co-directeur de thèse)**

**Maître de conférences agrégé à
l'EISMV de Dakar**



ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES DE DAKAR

**BP 5077-DAKAR (Sénégal)
Tel. : (221) 33 865 10 08- Télécopie : (221) 33 825 42**

COMITE DE DIRECTION

LE DIRECTEUR GENERAL

- **Professeur Louis Joseph PANGUI**

LES COORDONNATEURS

- **Professeur Germain Jérôme SAWADOGO**
Coordonnateur des Stages et
de la Formation Post-Universitaire
- **Professeur Moussa ASSANE**
Coordonnateur des Etudes
- **Professeur Yalacé Yamba KABORET**
Coordonnateur de la Coopération Internationale
- **Professeur Serge Niangoran BAKOU**
Coordonnateur Recherche / Développement

Année Universitaire 2011-2012

PERSONNEL ENSEGNANT

- ☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT E.I.S.M.V**
- ☞ **PERSONNEL VACATAIRE (PREVU)**
- ☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV**

A. DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES
ET PRODUCTIONS ANIMALES

CHEF DE DEPARTEMENT : Ayao MISSOHOU, Professeur

SERVICES

1. ANATOMIE-HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE

Serge Niangoran BAKOU	Maître de conférences agrégé
Gualbert Simon NTEME ELLA	Assistant
M. Jean Narcisse KOUAKOU	Moniteur
M.Mahamadou CHAIBOU	Moniteur

2. CHIRURGIE –REPRODUCTION

Papa El Hassane DIOP	Professeur
Alain Richi KAMGA WALADJO	Maître - Assistant
Mr Abdoulaye DIEYE	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mlle Rosine MANISHIMWE	Monitrice

3. ECONOMIE RURALE ET GESTION

Cheikh LY	Professeur (<i>en disponibilité</i>)
M. Walter OSSEBI	Docteur Vétérinaire Vacataire

4. PHYSIOLOGIE-PHARMACODYNAMIE-THERAPEUTIQUE

Moussa ASSANE	Professeur
Rock Allister LAPO	Maître – Assistant
M.Kader ISSOUFOU	Moniteur

5. PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur
Mr Adama SOW	Assistant
Mr Kalandi MIGUIRI	Docteur Vétérinaire Vacataire
Melle Clarisse UMUTONI	Monitrice

6. ZOOTECHNIE-ALIMENTATION

Ayao MISSOHOU	Professeur
Simplex AYSSIWEDE	Assistant
M. Célestin MUNYANEZA	Moniteur
M. fidèle ATAOUN	Moniteur

B. DEPARTEMENT DE SANTE PUBLIQUE ET ENVIRONNEMENT

CHEF DE DEPARTEMENT : Rianatou BADA ALAMBEDJI, Professeur

SERVICES

1. HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (HIDAOA)

Serigne Khalifa Babacar SYLLA	Maître - Assistant
Bellancille MUSABYEMARIYA	Assistante
M. Luc LOUBAMBA	Docteur vétérinaire vacataire
M. Than Privat DOUA	Moniteur

2. MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Rianatou BADA ALAMBEDJI	Professeur
Philippe KONE	Maître - Assistant
Mr Passoret VOUNBA	Docteur Vétérinaire Vacataire
Melle Fausta DUTUZE	Monitrice

3. PARASITOLOGIE-MALADIES PARASITAIRES-ZOOLOGIE APPLIQUEE

Louis Joseph PANGUI	Professeur
Oubri Bassa GBATI	Maître - Assistant
M. Mahamadou SYLLA	Moniteur
M. Steve NSOUARI	Moniteur

4. PATHOLOGIE MEDICALE-ANATOMIE PATHOLOGIQUE- CLINIQUE AMBULANTE

Yalacé Yamba KABORET	Professeur
Yaghoubba KANE	Maître de conférence agrégé
Mireille KADJA WONOU	Maître - Assistante
M. Richard MISSOKO MABEKI	Docteur vétérinaire vacataire
M. Mor Bigué DIOUF	Moniteur
Mr Omar FALL	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Alpha SOW	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Abdoulaye SOW	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Ibrahima WADE	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Charles Benoît DIENG	Docteur Vétérinaire Vacataire

5. PHARMACIE-TOXICOLOGIE

Assiongbon TEKOU AGBO	Chargé de recherche
Gilbert Komlan AKODA	Maître - Assistant
Mr Abdou Moumouni ASSOUMY	Assistant
M. Richard HABIMANA	Moniteur

C. DEPARTEMENT COMMUNICATION

CHEF DE DEPARTEMENT : Yalacé Yamba KABORET, Professeur

SERVICES

1. BIBLIOTHEQUE

Mme Mariam DIOUF	Vacataire
------------------	-----------

2. SERVICE AUDIO-VISUEL

Bouré SARR	Technicien
------------	------------

3. OBSERVATOIRE DES METIERS DE L'ÉLEVAGE (O.M.E.)

D. SCOLARITE

Mr Théophraste LAFIA	Vacataire
Mlle Aminata DIAGNE	Assistante de Directeur

II. PERSONNEL VACATAIRE (Prévu)

1. BIOPHYSIQUE

Boucar NDONG

Assistant
Faculté de Médecine et de Pharmacie
UCAD

2. BOTANIQUE

Dr Kandoura NOBA
Dr César BASSENE

Maître de Conférences (Cours)
Assistant (TP)
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

3. AGRO-PEDOLOGIE

Fary DIOME

Maître-Assistant
Institut de Science de la Terre (I.S.T.)

4. ZOOTECHNIE

Abdoulaye DIENG

Docteur Ingénieur ;
ENSA-THIES

Alpha SOW

Docteur vétérinaire vacataire
PASTAGRI

El Hadji Mamadou DIOUF

Docteur vétérinaire vacataire
SEDIMA

5. H I D A O A:

Malang SEYDI

Professeur
E.I.S.M.V – DAKAR

6. PHARMACIE-TOXICOLOGIE

Amadou DIOUF

Professeur
Faculté de Médecine et de Pharmacie
UCAD

IV. PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV

1. MATHEMATIQUES

Abdoulaye MBAYE

Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

2. PHYSIQUE

Amadou DIAO

Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

⌘ Travaux Pratiques

Oumar NIASS

Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

3. CHIMIE ORGANIQUE

Aboubacary SENE

Maître - Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

4. CHIMIE PHYSIQUE

Abdoulaye DIOP
Mame Diatou GAYE SEYE

Maître de Conférences
Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

⌘ Travaux Pratiques de chimie

Assiongbon TECKO AGBO

Assistant
EISMV – DAKAR

⌘ Travaux Dirigés de CHIMIE

Momar NDIAYE

Maître - Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

5. BIOLOGIE VEGETALE

Dr Aboubacry KANE
Dr Ngansomana BA

Maître - Assistant (Cours)
Assistant Vacataire (TP)
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

6. BIOLOGIE CELLULAIRE

Serge Niangoran BAKOU

Maître de conférences agrégé
EISMV – DAKAR

7. EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE

Malick FALL

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

8. PHYSIOLOGIE ANIMALE

Moussa ASSANE

Professeur
EISMV – DAKAR

9. ANATOMIE COMPAREE DES VERTEBRES

Cheikh Tidiane BA

Professeur
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

10. BIOLOGIE ANIMALE (Travaux Pratiques)

Serge Niangoran BAKOU

Maître de conférences agrégé
EISMV – DAKAR

Oubri Bassa GBATI

Maître - Assistant
EISMV – DAKAR

Gualbert Simon NTEME ELLA

Assistant
EISMV – DAKAR

11. GEOLOGIE :

⌘ FORMATIONS SEDIMENTAIRES

Raphaël SARR

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

⌘ HYDROGEOLOGIE

Abdoulaye FAYE

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

DEDICACES

Au nom d'ALLAH, le Clément, le Miséricordieux.

Louange à ALLAH, Seigneur de l'univers et que sa bénédiction et son salut soient sur notre prophète Muhammad (PSL), le sceau des prophètes et l'imam des pieux, ainsi que sur sa famille et l'ensemble des ses compagnons. Gloire à ALLAH grâce à qui ce travail a pu se réaliser.

Je dédie ce travail à :

**“ A mes très chers parents ”
Soumaila GARBA et Bibata SITA**

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Vous résumez si bien le mot parent qu'il serait superflu d'y ajouter quelque chose.

Que DIEU tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

**“ A mes petits frères ”
Abdoulaye SOUMAILA GARBA, Amadou SOUMAILA GARBA, Issiffou SOUMAILA
GARBA**

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Puisse l'amour et la fraternité nous unir à jamais. Ce travail est le votre.

Je vous invite à faire mieux. Je vous assure de mon soutien infaillible.

Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

**“ A la mémoire de mes grands parents ”
Garba TAHIROU et Fatoumata MAIGA**

Je ne vous ai pas assez connus mais aujourd'hui mes pensées sont tournées vers vous. Puisse DIEU tout puissant assurer le repos de vos âmes par sa sainte miséricorde.

**“ A mes grands parents ”
Sita BAOUNA, Abdoulaye MAIGA, Amina HAROUNA, Maimouna TOURE**
Puisse DIEU vous protéger du mal, vous procurer une longue vie pleine de bonheur.

“ A la mémoire de mes oncles”

Amadou GARBA et Ali SITA

*Je ne vous ai pas connus mais aujourd’hui mes pensées sont tournées vers vous.
Puisse DIEU tout puissant assurer le repos de vos âmes par sa sainte miséricorde.*

“ A mes oncles et tantes paternels et leurs familles”

Zibo GARBA, Saley GARBA, Mariama GARBA

Veillez accepter l’expression de ma profonde gratitude pour votre soutien, encouragement et affection, j’espère que vous trouverez dans la dédicace de ce travail le témoignage de mes sentiments sincères et de mes vœux de santé et de bonheur.

“ A mes oncles et tantes maternels et leurs familles”

Hassane SITA, Diallo SITA, Djana SITA, Kadi SITA, Haoua SITA, Aissa SITA, Aziz SITA, Zeinabou MAIGA, Fatoumata MAIGA, Mamata MAIGA, Albert MAIGA, Aissa MAIGA

Avec toute mon estime, affection et respect. Je vous souhaite santé, bonheur et prospérité.

“ A mes cousins, cousines, neveux et nièces”

En témoignage de mon respect et de mon profond attachement, je vous souhaite longue et heureuse vie.

“ Aux familles”

Hamidou HASSIMI, Amadou IDRISMA MAIGA, Issoufou ABOUBACAR, Soumana ZANGUINA, Adamou AGOUMO,

*Merci pour votre générosité et pour les bons moments que l’on a passés ensemble.
Je vous remercie pour tous ce que vous m’avez apportés.*

“ A Mohamadou (Mayna), Kikiss (Hadiza) et Sita Diallo”

En témoignage de mon affection et de mon respect.

“ Aux familles”

bdoulaye MOUMOUNI, Inoussa BAKO, Mamane WADE, Ly DIA, SEINI BAGNOU, Mère NDIAYE

*Vous êtes une famille pour moi
Merci pour votre générosité et pour les bons moments que l’on a passés ensemble.*

“A mes promotionnaires ”

Sadissou ALASSANE, Boubacar ABDU SOUMANA, Chaibou MAHAMADOU, Seydou AMADOU HAMIDOU, Amadou MAM NOURI, Talimba SOUROUMPO, Kader ISSOUFOU, Fatima MAMAN

Merci pour les bons moments que l’on a passés ensemble, de votre soutien et de votre serviabilité.

“ A mes sœurs de cœurs ”

Habibata ZERBO et Gisèle PARE

Plusieurs personnes entrèrent ou sortirent de ta vie mais seulement les vrais amis laisseront une empreinte dans ton cœur. On a connu des tourments et on a partagé nos peurs, nos pleurs, nos rêves. On a eu des petites querelles mais on s’est toujours suivi, soutenu et encouragé ce qui a renforcé cette amitié exceptionnelle. Que DIEU vous procure joie et bonheur et que notre amitié reste à jamais.

“A notre ainée ”

Halima ADAMOU HAROUNA et à sa famille pour sa générosité et son soutien.

“A mes cadets et cadettes de l’AEVND”

Ce travail est le votre. Je vous invite à faire mieux.

“A mes amis de la 39 ème promotion ”

Trop nombreux pour que je les cite tous, à qui je tiens énormément et qui me le rendent bien; en espérant avoir encore l’occasion de partager de nombreux moments forts.

A tous les jeunes gens que j’ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années à savoir Nana Barira, Safia, Mariama, Aminata, Dahourou, Halima, Bernadette, Nadège, Madina, Frank,

A tous les étudiants de l’AEVD

A tous ceux ou celles qui me sont chers, et que j’ai involontairement omis de citer.

A tous mes enseignants tout au long de mes études.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A tous ceux qui ont cette pénible tâche de soigner les animaux et de soulager leur souffrance.

Au NIGER ma patrie et au SENEGAL ma terre d’accueil.

REMERCIEMENTS

Il m'est très agréable de réserver cette page comme un témoin de reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont soutenu et encadré pour réaliser ce travail

Mon tout premier remerciement est dédié au professeur Rianatou BADA ALAMBEDJI qui, en tant que Directeur de thèse, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de cette thèse, ainsi que pour l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

J'aimerais également la remercier très chaleureusement de m'avoir soutenue lors mes nombreuses démarches particulières pour mes futures études postdoctorales.

Sincères remerciements au professeur John Fairbrother, directeur du laboratoire EcL pour avoir accepté d'analyser les souches ayant fait l'objet de ce travail.

*Je tiens à remercier ici Monsieur Moussa ASSANE professeur à l'EISMV de Dakar.
Vos qualités intellectuelles et humaines forcent le respect et l'admiration.
Sincères remerciements et profonde reconnaissance.*

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Moussa Sène technicien au laboratoire de MIPI, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire de MIPI. Le séjour a été trop bref mais riche d'enseignements, aussi bien sur le plan théorique que pratique.

*Au Docteur Passoret VOUNBA pour la gentillesse et la patience qu'il a manifestées à mon égard durant cette thèse. Pour son implication dans mes travaux, son aide, ses explications, sa disponibilité, et son accompagnement moral.
En témoignage de notre profonde estime et de nos sincères remerciements.*

Que soient également remerciés ici les Docteurs Richard MABEKI, Jean François AGUE KOFFI, Joé DOUMANA, Victor ALLANONTO pour la sympathie qu'ils m'ont témoignée. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques, et suggestions à améliorer la qualité de cette thèse et je leur en suis très reconnaissante.

Merci aussi à Sadissou, Gisèle, Habiba, Bernadette, Halima, Madina et Fidèle pour leur aide.

Que Madame Mariam DIOUF, bibliothécaire à l'EISMV de Dakar, trouve ici l'expression de ma gratitude pour ces précieuses indications documentaires

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse de doctorat à mes parents et aux quelques amis que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés, qui m'ont soutenu tout au long de ces années de travail.

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre Maître et Président de jury

Monsieur Bernard Marcel DIOP

Professeur à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar

Vous nous avez fait l'honneur de bien vouloir assurer la présidence ce jury de thèse. Nous vous remercions pour vos conseils et pour votre disponibilité. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements et de notre profonde gratitude.

A notre maître, Directeur et Rapporteur de thèse

Madame Rianatou BADA ALAMBEDJI

Professeur à l'EISMV de Dakar

Vous avez accepté de nous encadrer et de diriger ce travail avec rigueur, simplicité et efficacité. Votre expérience et la rigueur logique de votre raisonnement scientifique ont été pour nous un apport précieux et hautement profitable. Nous vous remercions pour votre soutien, la pertinence de vos conseils, votre grande disponibilité et votre patience. Soyez assuré de notre admiration et de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge,

Monsieur Yaghouba KANE

Maître de conférences agrégé à l'EISMV de Dakar

*Vous nous faites un honneur en acceptant de juger avec abnégation ce travail malgré votre calendrier très chargé. Vos grandes qualités scientifiques, intellectuelles et votre sympathie nous inspirent admiration.
Profonde reconnaissance*

A notre maître et juge

Monsieur Germain J.SAWADOGO

Professeur à l'EISMV de Dakar

*En dépit de la charge de travail qui vous incombe, vous avez accepté de faire partie de notre jury et de juger notre travail. Vos grandes qualités scientifiques et intellectuelles nous inspirent admiration.
Sincères remerciements.*

« Par délibération, la faculté et l'école ont décidé que les opinions émises dans les dissertations qui leurs sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leurs donner aucune approbation, ni improbation ».

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% :	pour cent
°C :	degré Celsius
µl :	microlitre
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AEEC :	Attaching and Effacing <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> inducteurs des lésions d'attachement et d'effacement des villosités intestinales)
AFSSA :	Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments
APEC :	Avian Pathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> pathogènes d'origine aviaire)
CNA :	Centre National d'Aviculture
CNF :	Cell Necrotising Factor (Facteur Nécrosant des Cellules)
DAEC :	Diffuse adhering <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> à adhérence diffuse)
DIREL :	Direction de l'élevage (SENEGAL)
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate
<i>eae</i> :	gène codant pour l'intimine, l'adhésine associée aux lésions d'attachement et d'effacement des <i>E. coli</i>
EcL :	<i>Escherichia coli</i> Laboratory (Laboratoire de l'OIE pour <i>E. coli</i>)
<i>ehx</i> :	gène codant pour l'entéro-hémolysine
ETEC :	enterotoxigenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entérotoxigènes)
ExPEC :	extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux)
FAO :	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
for :	forward (brin principal d'ADN)
<i>iucD</i> :	iron uptake chelate gene (gène codant pour la chélation du fer)
LB :	milieu de Luria Bertani
LT :	entérotoxine thermolabile
MgCl₂ :	chlorure de magnésium
ml :	millilitre
MIPI :	Microbiologie, Immunologie et Pathologie Infectieuse
mTSB :	bouillon de soja tryptique (TSB) modifié par ajout de sels biliaires
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
<i>pap</i> :	gène codant pour le fimbriae de type P

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
rev : reverse (brin d'ADN anti-sens)
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 : gène codant pour l'hémagglutinine thermosensible
UPEC : uropathogenic *E. coli* (*E. coli* uropathogènes)
stx1 (stx2) : gène codant pour la production des shiga-toxines 1 ou 2.

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Carte du Sénégal	5
Figure 2 : Évolution de la production de viande de poulet de chair de 2000 à 2008	8
Figure 3 : Colisepticémie : carcasse rouge, foie dégénéré et aspect luisant.....	15
Figure 4 : Colibacillose aviaire : Péricardite et périhépatite fibrineuses aigües.....	15
Figure 5 : Infection colibacillaire de la grappe ovarienne accompagnée d'une salpingite.....	15
Figure 6: Morphologie et structure de la bactérie <i>E. coli</i>	23
Figure 7: structure de la membrane des bactéries à Gram négatif	24
Figure 8 : Image d'une électrophorèse pour les gènes de virulence des ExPEC	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Quantités d'aliments volailles produites en 2007	6
Tableau II : Répartition des souches selon leur origine	41
Tableau III : Composition et quantités nécessaires pour un master mix pour 30 réactions PCR..	47
Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour la détection par PCR mutiplexe des gènes de virulence des ExPEC et des STEC	48
Tableau V : Composition et quantités nécessaires pour un master mix pour 40 réactions PCR	49
Tableau VI : Séquences de amorces utilisées pour la détection par PCR multiplexes des sérotype O	50
Tableau VII: Cycles de température pour la détection des gènes de virulence des souches d' <i>E.coli</i> d'origine aviaire.....	51
Tableau VIII: Cycles de température pour le serotypage des souches d' <i>E.coli</i> d'origine aviaire des souches d' <i>E.coli</i> d'origine aviaire..	52
Tableau IX : Prévalence des résistances aux antibiotiques des souches d' <i>E.coli</i> aviaires testées	55
Tableau X : Prévalence des gènes de virulence des souches d' <i>E.coli</i> aviaires testées	57
Tableau XI : Prévalence des virotypes des souches d' <i>E.coli</i> aviaires testées	57
Tableau XII : Prévalence des sérotypes des souches d' <i>E.coli</i> aviaires testées.....	58
Tableau XIII : Prévalence des séro-virotypes des souches d' <i>E.coli</i> aviaires testées.....	58

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
<i>Première partie : Synthèse bibliographique</i>	4
Chapitre I : IMPORTANCE DES COLIBACILLOSES EN ELEVAGE AVICOLE AU SENEGAL.....	5
I.1 Présentation du Sénégal	5
I.2 L'aviculture au Sénégal	6
I.2.1 L'aviculture dans l'économie du SENEGAL	6
I.2.1.1 La contribution de l'aviculture à la formation du PIB primaire	6
I.2.1.2 La contribution de l'aviculture à la création d'emplois	7
I.2.1.3 Contribution de l'aviculture à la satisfaction de la demande en protéines animales	7
I.2.1.4 Contribution de l'aviculture à la gestion des rapports sociaux	8
I.2.2 Les systèmes d'élevage avicole au SENEGAL	8
I.2.3 Les contraintes de l'aviculture au SENEGAL	9
I.2.3.1 Contraintes zootechniques	9
I.2.3.2 Contraintes technico – économiques	10
I.2.3.3 Contraintes pathologiques (BULDGEN et <i>al.</i> , 1992).....	10
I.3 Les colibacilloses aviaires.....	12
I.3.1 Définition	12
I.3.2 Historique.....	12

I.3.3	Importance	13
I.3.4	Epidémiologie analytique	13
I.3.5	Etude clinique	14
I.3.5.1	La colisepticémie et les colibacilloses respiratoires	14
I.3.5.2	Ovarites et salpingites chez l'adulte.....	16
I.3.5.3	Mortalité embryonnaire et mortinatalité	17
I.3.5.4	Formes rares.....	17
I.3.6	Diagnostic	17
I.3.6.1	Diagnostic clinique	17
I.3.6.2.	Diagnostic différentiel	18
I.3.6.3	Diagnostic de laboratoire	18
I.3.7	Moyens de lutte.....	18
I.3.7.1	Prophylaxie	18
I.3.7.1.1	Prophylaxie sanitaire.....	18
I.3.7.1.2	Prophylaxie médicale	19
I.3.7.2	Traitement.....	19

I.5. Colibacilloses aviaires et santé publique	20
Chapitre II : LES CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES	
ASSOCIEES AUX <i>Escherichia coli</i>	21
II.1 Présentation de la bactérie	21
II.1.1 Caractères généraux des entérobactéries	21
II.1.2 L'espèce <i>Escherichia coli</i>	21
II.1.2.1 Caractères culturaux	22
II.1.2.2 Caractères biochimiques.....	22
II. 1.2.3 Morphologie	22
II.1.2.4 Structure.....	23
II.1.2.5 Structure antigénique.....	24
II.1.2.6 Pouvoir pathogène	25
II.1.2.7 Pouvoir immunogène.....	26
II.2 Principaux pathotypes et sérotypes associés aux <i>E. coli</i> pathogènes	26
II.2.1 <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC)	26
II.2.2 <i>Escherichia coli</i> producteur de lésions de type attachant et effaçant (AEEC)	26
II.2.3 <i>Escherichia coli</i> uropathogène (UPEC).....	27
II.2.4 <i>Escherichia coli</i> à adhérence diffuse (DAEC).....	27
II.2.5 <i>Escherichia coli</i> producteur de toxine Shiga (STEC)	27
II.2.6 <i>Escherichia coli</i> extra-intestinal (ExPEC)	28

II.3 Facteurs et gènes de virulence associés aux ExPEC aviaires (APEC).....	29
II.3.1 Adhésines.....	29
II.3.2 Capsule.....	29
II.3.3 Aéro bactéine.....	30
II.3.4 Cytotoxines.....	30
II.4 Facteurs et gènes de virulence associés aux STEC.....	30
II.4.1 Shigatoxines.....	30
II.4.2 Facteurs d'adhésion, d'attachement et d'effacement.....	31
II.4.3 Entérohémo lysine.....	31
II.5 Prévalence des facteurs et gènes de virulences et des sérotypes des <i>Escherichia coli</i> d'origine aviaire dans le monde.....	31
Chapitre III : RESISTANCE DES <i>ESCHERICHIA COLI</i> AUX ANTIBIOTIQUES.....	34
III.1 Mise en évidence (Antibiogramme).....	34
III.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	34
III.2.1 Mécanismes biochimiques.....	34
III.2.1.1 Modification de la perméabilité de la membrane externe.....	35
III.2.1.2 Modification de la cible ou substitution de la cible par les sulfamides.....	35
III.2.1.3 Synthèse d'enzymes d'inactivation de l'antibiotique.....	35
III.2.1.4 Efflux actif de l'antibiotique.....	35

III.2.2 Mécanismes Génétiques	36
III.2.2.1 Supports génétiques de la résistance	36
III.2.2.1.1 Chromosomes.....	36
III.2.2.1.2 Plasmides	36
III.2.2.1.3 Transposons.....	36
III.2.2.1.4 Intégrons.....	37
III.2.2.2 Mécanismes d'acquisition de la résistance aux antibiotiques	37
III.3 Prévalence de la résistance des <i>Escherichia. coli</i> aux antibiotiques dans le monde	37
Deuxième partie : Etude expérimentale	40
Chapitre I : MATERIEL ET METHODES	41
I.1. Contexte de l'étude	41
I.2 Matériel	41
I.2.1 Matériel biologique	41
I.2.2 Matériel de laboratoire	42
I.2.2.1 Matériel et milieu de repiquage et d'identification des <i>Escherichia. coli</i>	42
I.2.2.2 Matériel et réactifs de l'antibiogramme	42
I.2.2.3 Matériel et milieu d'extraction de L'ADN	42
I.2.2.4 Matériel et réactifs de la PCR	42
I.2.2.5 Matériel et réactifs de l'électrophorèse.....	43

I.3 Méthodes.....	42
I.3.1 Repiquage des souches et identification	43
I.3.2 Antibiogramme	42
I.3.3 Caractérisation génétique des <i>Escherichia coli</i>	44
I.3.3.1 Objectif	44
I.3.3.2 Principe	45
I.3.3.3 Méthodologie	45
I.3.3.3.1 Préparation de l'échantillon	45
I.3.3.3.2 Extraction de l'ADN	46
I.3.3.3.3 Réactions PCR pour la recherche des gènes de virulence et des sérotypes	46
I.3.3.3.3.1 Recherche des gènes de virulence	46
I.3.3.3.3.2 Recherche des sérotypes	49
I.3.3.3.4 Réalisation de la PCR	51
I.3.3.3.5 Électrophorèse sur gel d'agarose	52
I.3.3.3.5.1 Préparation du gel	52
I.3.3.3.5.2 Réalisation de l'électrophorèse	52
I.2.4 Analyses statistiques	53
Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION	54

II.1 Résultats.....	54
II.1.1 Prévalence des résistances aux antibiotiques.....	54
II.1.2 Présentation des résultats des PCR.....	56
II.1.1.4 Prévalence des séro-virotypes	58
II.2 Discussion.....	59
II.2.1 Méthodologie.....	59
I.2.1.1 Choix des antibiotiques testés	59
II.2.1.2 Choix des gènes et des sérotypes testés	59
II.2.1.2 Choix des gènes et des sérotypes testés.....	59
II.2.2 Résultats.....	60
II.2.2.1 Résultats de l'antibiogramme	60
II.2.2.2 Résultats de la PCR	62
RECOMMANDATIONS	66
CONCLUSION GENERALE	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET WEBOGRAPHIQUES	72
ANNEXE	81

INTRODUCTION

Depuis le 24 novembre 2005, la mesure d'interdiction de toute importation de viandes et des produits de volailles prise au Sénégal en raison du principe de précaution contre toute apparition de la grippe aviaire, a permis la relance de l'aviculture moderne locale dont les effectifs ne cessent de croître.

Les élevages modernes se concentrent principalement à la périphérie des grandes villes du pays, principalement à Dakar, Thiès et à Saint-Louis. Ils sont estimés à 13,2 millions de sujets, dont 13,7% de poules pondeuses et 86,3% de poulets de chairs pour un chiffre d'affaires de 89,41 milliards de FCFA en 2008 (CNA, 2008). Mais l'intensification de cet élevage avicole n'évolue pas sans problème car elle s'accompagne de pathologies responsables de fortes mortalités qui grèvent sérieusement le budget des éleveurs (ABDEL-AZIZ, 2007).

C'est le cas des colibacilloses pour lesquelles, AMARA (1996) a révélé que les souches d'*E. coli* qui y sont responsables chez les poulets de chair au Maroc, présentent des fréquences de résistance aux antibactériens très élevées avec une tendance nette à la multirésistance.

On note une perte annuelle de 6 millions d'euros en Angleterre due à l'impact des colibacilloses aviaires (STORDEUR et MAINIL, 2002).

Afin d'approfondir les connaissances sur cette affection au Sénégal et de mieux affiner le diagnostic de cette maladie, une étude portant sur le diagnostic clinique et de laboratoire de la colibacillose a été menée en 2010 par NDIAYE (2010). Cette étude a permis d'isoler et d'identifier des souches d'*E. coli* sur la base de tests biochimiques. Cependant ces souches ne peuvent être systématiquement incriminées car il existe également des *E. coli* commensaux. Néanmoins, ces souches commensales peuvent devenir pathogènes par acquisition de certains facteurs de virulence.

Parmi les souches pathogènes d'*E. coli*, il y a des souches appelées APEC (Avian pathogenic *E. coli*) pathogènes uniquement pour les volailles et STEC (Shigatoxin producing *E. coli*) pathogènes pour les autres espèces animales dont l'Homme et pour lesquelles les volailles peuvent être des hôtes réservoirs (FAIRBROTHER et NADEAU, 2006).

Les *E. coli* pathogènes sont également classés en sérotypes sur la base de la possession des antigènes de la paroi (Ag O), capsulaires (Ag K) et flagellaires (Ag H) (DHO-MOULIN et

FAIRBROTHER, 1999) et se caractérisent par la possession des facteurs de virulence contrôlés par des gènes de virulence.

La recherche de la production d'hémolysine par une souche d'*E. coli* et le sérotypage sont des opérations couramment réalisées au laboratoire. De ce fait certains sérotypes ont été particulièrement associés aux souches APEC : O1, O2, O78 (**DHO-MOULIN et FAIRBROTHER, 1999**).

Le sérotypage de l'isolat est nécessaire, mais ne permet pas toujours de conclure sur la pathogénicité de la souche identifiée (**BOISSIEU et GUERIN, 2008**).

De même l'hémolysine est le premier facteur de virulence recherché et bien souvent le seul lors de l'isolement et l'identification des *E. coli* pathogènes, ce qui n'est pas suffisant.

En somme, la détermination du sérotype et la recherche de la production d'hémolysine restent très informatives au niveau épidémiologique mais ne renseignent pas sur le pouvoir pathogène prédictif de la souche. En effet elles ne renseignent pas sur les capacités de la bactérie à coloniser la muqueuse, à franchir cette muqueuse, à résister au système immunitaire ou encore à induire un effet cytotoxique.

Ainsi, le diagnostic de certitude d'une colibacillose aviaire au laboratoire reste donc la recherche des gènes de virulence notamment par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

C'est dans cette optique que la présente étude a été menée et dont l'objectif général est de caractériser génétiquement les souches d'*E. coli* isolées des cas de colibacilloses au Sénégal tout en étudiant leur résistance aux antibiotiques.

De façon spécifique, ce travail consiste à :

- identifier les antibiotiques auxquels ces souches d'*E. coli* sont résistantes
- identifier les sérotypes des souches d'*E. coli* isolées des cas cliniques
- déterminer les gènes de virulence de ces souches et leurs virotypes c'est-à-dire leur profil de virulence

Cette étude comprend deux parties :

- une première partie consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle sont traitées l'aviculture au Sénégal, les colibacilloses aviaires suivies par une présentation des *E. coli* pathogènes et enfin de la résistance aux antibiotiques.
- une deuxième partie expérimentale comprenant le matériel et les méthodes, les résultats qui sont ensuite discutés et suivis de recommandations.

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : L'IMPORTANCE DES COLIBACILLOSES EN ELEVAGE AVICOLE AU SENEGAL

I.1 Présentation du Sénégal

Le **Sénégal**, ou la **République du Sénégal**, d'une superficie de 196 192 km² est un pays situé à l'extrême ouest du continent africain. Il est bordé par l'océan Atlantique à l'ouest, la Mauritanie au nord et à l'est, le Mali à l'est et la Guinée et la Guinée-Bissau au sud. La Gambie forme une quasi-enclave dans le Sénégal, pénétrant à plus de 300 km à l'intérieur des terres. Les îles du Cap-Vert sont situées à 560 km de la côte sénégalaise.

Le pays doit son nom au fleuve Sénégal long de 1700 km qui prend sa source dans le Fouta Djallon en Guinée et borde le pays au nord et à l'est constituant ainsi ses frontières avec la Mauritanie et le Mali (**Figure 1**).

Le climat est tropical et sec avec deux saisons : la saison sèche et la saison des pluies.

Le pays est divisé en 14 régions à savoir Dakar la capitale, Diourbel, Fatick, Kaffrine, Kédougou, Kaolack, Kolda, Louga, Matam, Saint Louis, Sédhiou, Tambacounda, Thiès, Ziguinchor, 34 départements, 64 communes, plus de 100 arrondissements et plus de 300 communautés rurales. Selon les projections estimées en 2011, de l'Agence Nationale de la Démographie et des Statistique (ANSD), la population sénégalaise est estimée à 12 855 153 d'habitants, soit une densité moyenne de 65, 3 habitants au km². Elle est inégalement répartie sur le territoire et compte une vingtaine d'ethnies.



Figure 1 : Carte du Sénégal

Source : <http://www.kbinirsnb.be/cb/antelopes/Cartography/Cartography/Senegal%20carte.jpg>

I.2 L'aviculture au Sénégal

I.2.1 L'aviculture dans l'économie du Sénégal

Au Sénégal, le secteur avicole représente une capacité de production de 17 millions de poussins qui contribue à la couverture de la demande totale actuelle représentée par le cumul des importations et des exportations et qui est de l'ordre de 12 552 000 poussins (NDAO, 2011).

I.2.1.1 La contribution de l'aviculture à la formation du PIB primaire

La contribution de l'aviculture est de 23 milliards de F CFA soit 16 à 17% du PIB de l'élevage avec une croissance de 21% en sous filière chair et 40% en sous filière ponte de 1999 à 2001 (TENNO, 2010).

En 2003, on note une production d'œufs de consommation de 337 millions d'unités représentant un chiffre d'affaires de 21,5 milliards de FCFA et une production de viandes de volaille en 2003 de 5982 tonnes représentant un chiffre d'affaires de 9 milliards de FCFA soit un chiffre d'affaires total de l'ordre de près de 30 milliards de F CFA (NDAO,2011).

La filière avicole sénégalaise représente une capacité de production d'au moins 183 000 tonnes d'aliments. La production totale d'aliments commercialisée par les industriels en 2003 est estimée à 72 000 tonnes. Le Centre National d'Aviculture a estimé en 2007 cette production à 156 074 tonnes (**Tableau I**) contre 79 501 tonnes en 2006 soit une hausse de 96%. La production d'aliments volailles est essentiellement assurée par trois sociétés de la place à savoir SEDIMA, NMA et SENTENAC dont les parts en 2007 sont respectivement de 34%, 27% et 18% (OULON,2009).

Tableau I : Quantités d'aliments volailles produites en 2007

TYPE D'ALIMENT	QUANTITES PRODUITES EN TONNES
ALIMENT "CHAIR"	39 080
ALIMENT "POULETTES"	54 191
ALIMENT "PONDEUSES"	62 801
TOTAL	156 074

Source : CNA, 2008

I.2.1.2 La contribution de l'aviculture à la création d'emplois

Le système avicole dit moderne emploie plus de 10 000 personnes (**DIREL, 2007**).

L'aviculture joue un rôle capital dans la lutte contre la pauvreté, en constituant une des activités de prédilection pour l'insertion des jeunes, des femmes, mais également comme activité de complément de revenu pour de nombreux actifs (**NDAO, 2011**).

I.2.1.3 Contribution de l'aviculture à la satisfaction de la demande en protéines animales

Dans les pays africains où l'alimentation humaine est un problème préoccupant tant au niveau de la quantité que de la qualité, l'aviculture rurale reste une alternative pour réduire le déficit protéino-calorique. Au Sénégal, malgré leur petite taille, les exploitations avicoles familiales rurales contribuent substantiellement à la production de viande. D'après les statistiques de l'élevage, l'aviculture prise globalement contribuait à 27 % de la production nationale en produits carnés en 2005. L'aviculture traditionnelle à elle seule contribuait à hauteur de 16 % dans cette production nationale en produits carnés. La part du poulet de race locale dans la production nationale en viandes avicoles était ainsi chiffrée à 61,26% en 2005 (**TENO, 2010**).

La production villageoise de viandes de volailles a été estimée autour de 20.000 tonnes en 2006, correspondant à un peu moins de 21 millions de volailles abattues. L'aviculture moderne s'occupe pour sa part de la production des poulets de chair et des œufs de consommation. La particularité pour l'année 2006 aura été l'absence de viandes de volaille importées en raison de l'interdiction d'importer ce produit, mesure intervenue en novembre 2005, pour cause de grippe aviaire. Cependant, depuis la suspension en 2005, les productions nationales de poulets de chair ne cessent d'augmenter atteignant plus de vingt mille tonnes en 2008 (**Figure 2**) (**OULON, 2009**).

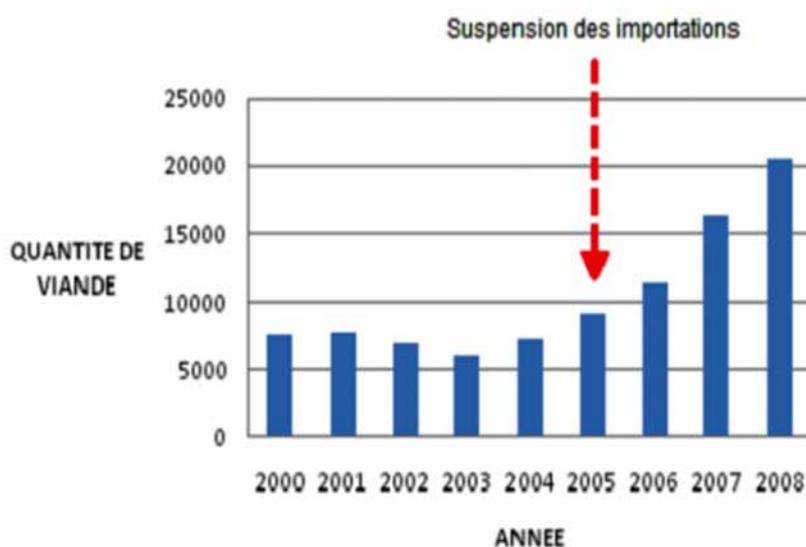


Figure 2 : Évolution de la production de viande de poulet de chair de 2000 à 2008

Source : CNA, 2008

I.2.1.4 Contribution de l'aviculture à la gestion des rapports sociaux

En Afrique en général et particulièrement au Sénégal, le poulet intervient dans diverses cérémonies rituelles et religieuses (naissances, baptêmes, circoncisions, mariages, décès...)

Une part plus ou moins importante de poules est utilisée pour les sacrifices rituels ou culturels. La robe de la poule (blanche, noire ou blanche tachetée de noir) et l'aspect du plumage (lisse ou plissé) sont importants à considérer pour ces sacrifices. L'enquête révèle que ces pratiques sont beaucoup plus courantes dans les zones les moins islamisées notamment en pays Sérères et Diolas. Enfin, il existe en pays Sérère dans la région de Fatick des pratiques de trocs qui consistent en un échange d'un certain nombre de poules contre une chèvre ou une brebis. Ce phénomène de troc est également courant dans la région de Kolda. Le motif évoqué est le même ; une fortune stable et saine doit être bâtie à partir de volaille (TRAORE, 2006).

I.2.2 Les systèmes d'élevage avicole au SENEGAL

En plus du système d'exploitation avicole villageois et des élevages de basse-cour (élevage de souches locales) rencontrés dans quelques agglomérations, le système d'élevage dit moderne peut être divisé en quatre sous systèmes ou secteurs (FAO, 2006) :

✓ **Secteur 1 ou système d'élevage industriel**

Ce système intensif n'est pas fréquent mais commence à se développer. Il regroupe moins d'une dizaine de producteurs presque tous installés à Dakar. Deux ou trois unités industrielles de production avicole intégrées situées à Dakar sont constantes, d'autres unités s'installent et disparaissent au cours des années.

✓ **Secteur 2 ou système d'élevage intensif de poulets commerciaux**

Ce secteur de haute production regroupe l'essentiel des aviculteurs dits du secteur moderne (plus de 80% des effectifs avicoles élevés). Les producteurs de ce groupe se rencontrent surtout dans la zone des Niayes de Dakar et de Thiès.

✓ **Secteur 3 ou système d'élevage semi intensif et élevages amateurs**

Les élevages semi intensifs et / ou élevages amateurs de volailles se rencontrent essentiellement dans les habitations au centre et en banlieues des grandes villes et autour de quelques autres agglomérations et communes rurales.

✓ **Secteur avicole familial ou système d'élevage avicole de basse-cour**

Cette activité correspond à l'élevage de la poule commune ou poule domestique appelée *Gallus gallus*. Cet élevage est pratiqué dans tout le pays.

I.2.3 Les contraintes de l'aviculture au Sénégal

I.2.3.1 Contraintes zootechniques

L'insuffisance du niveau technique des éleveurs et l'insuffisance d'organisation des producteurs sont des facteurs qui entravent la productivité des élevages modernes.

Les défaillances observées dans l'application des normes techniques d'élevage sont à l'origine de mauvaises performances. En effet, la mauvaise conception des bâtiments, les vides sanitaires mal effectués et l'absence d'hygiène souvent constatée dans les fermes ont des conséquences néfastes en élevage intensif (**BIAOU, 1995**).

Ces élevages ne respectent pas (ou les éleveurs ne les connaissent pas) les normes de densité généralement requises pour les poulets de chair (10 adultes par m²) et la conduite des élevages dépend plutôt des moyens financiers et matériels de l'éleveur (**FAO, 2006**).

La qualité nutritive des aliments fabriqués de façon artisanale dans certaines fermes avicoles non qualifiées, la distribution irrégulière et en quantité insuffisante des aliments ainsi que la

rupture prolongée des stocks d'aliments dans les fermes ne favorisent pas une production optimale de ces fermes (MOUGANG, 2008).

I.2.3.2 Contraintes technico – économiques

L'élevage des poulets de chair comme celui des poules pondeuses n'est pas accessible à toutes les couches de la population sénégalaise. En effet, cet élevage demande des moyens financiers importants. En général, les poussins, les médicaments et 85 % du maïs destinés aux fabriques d'aliments sont des intrants importés. Les producteurs éprouvent d'énormes difficultés pour obtenir des financements nécessaires à l'achat des équipements avicoles (HABAMENSHI, 1994).

L'aviculture intensive urbaine et périurbaine de façon générale, représente un important investissement financier évalué à plus de 20 milliards de Francs CFA. Les investissements sont essentiellement sur fonds propres, destinés à financer les bâtiments d'élevage et leur matériel, les installations des couvoirs (bâtiments, couveuses, éclosiers et autres accessoires), les unités de fabrication d'aliments ou les usines d'aliments (bâtiments, fabriques et accessoires...) etc (FAO,2006).

La mauvaise organisation du marché et le manque de chaîne de froid pour conserver les produits invendus font que beaucoup d'aviculteurs sénégalais se limitent à des opérations ponctuelles liées à des festivités d'origines religieuses, coutumières ou familiales (SENEGAL/MA/DIREL, 1995). En plus des contraintes technico-économiques s'ajoutent les contraintes pathologiques.

I.2.3.3 Contraintes pathologiques (BULDGEN et al., 1992)

Elles sont principalement d'origine parasitaire et infectieuse.

✓ Les maladies parasitaires

Elles sont les plus nombreuses et sont responsables de la mortalité ou des retards de croissance dans les élevages.

On retrouve entre autres :

- Les coccidioses aviaires dues à *Emericia tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, ou *E. proecox*
- L'ascaridiose due à *Ascaridia*, *Cappillaria*, ou *Heterakis*
- Les Téniasis dues à *Rallietina*, ou *Hymenolopis*

✓ Les maladies infectieuses

Elles rassemblent les maladies virales et bactériennes.

Les pathologies d'origine virale constituent les maladies les plus graves car en plus des énormes dégâts qu'elles entraînent, il n'existe aucun traitement contre ces maladies. On peut citer :

- La maladie de Gumboro due à un Birnavirus
- La maladie de Newcastle ou pseudo peste aviaire due à un Paramyxovirus
- La variole aviaire due à un Poxvirus
- Les leucoses aviaires dues à des rétrovirus
- La bronchite infectieuse due à un Coronavirus
- La maladie de Marek due à un Herpes virus

Parmi les maladies bactériennes et mycoplasmiques on peut citer

- Le cholera aviaire dû à *Pasteurella multocida*
- Les salmonelloses aviaires dues à *Salmonella pullorum gallinarum*
- Les mycoplasmoses dues à *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* et les autres mycoplasmes
- Les colibacilloses dues à *Escherichia coli*

Bien que les maladies parasitaires soient les plus fréquentes, il faut remarquer que les maladies infectieuses (bactérienne et virale) sont les plus redoutables, puisque leurs importances médicale et économique sont généralement catastrophiques.

C'est le cas des colibacilloses aviaires qui sont les infections bactériennes les plus fréquentes chez les volailles.

A Dakar, sur les 52 échantillons prélevés sur des cas de colibacilloses aviaires, 30 souches d'*E. coli* dont 26 sur des poulets de chair et 4 chez des pondeuses, ont été isolées soit un

pourcentage de 55,6%. La localité de Keur Mbaye FALL enregistre plus de colibacilloses avec 11 souches sur les 30. L'augmentation de la fréquence d'isolement de ce germe dans cette localité peut être imputée au manque d'hygiène. Les cas de colibacilloses sont beaucoup plus importants chez les chairs que chez les pondeuses. Ce qui pourrait s'expliquer par le nombre élevé de chair dans la zone (39644) par rapport aux pondeuses (12650). A Thiès, sur les 48 échantillons, 24 souches d'*E. coli* ont été isolées dont 10 sur des poulets de chairs et 14 chez des pondeuses, soit un pourcentage de 44,4%. Les localités de Peykouck et de Pout enregistrent plus de colibacilloses et les cas sont plus importants chez les pondeuses que chez les chairs. Ceci pourrait s'expliquer qu'à Thiès la spéculation ponte (23876) est plus élevée par rapport à la spéculation chair (9372) (NDIAYE, 2010).

Les colibacilloses aviaires représentent vraisemblablement la première cause de traitement antibiotique dans les élevages et l'émergence de souches d'*E. coli* résistantes est une préoccupation légitime. C'est pourquoi une revue générale est accordée à cette affection.

I.3 Les colibacilloses aviaires

I.3.1 Définition

Les colibacilloses sont sans doute les infections bactériennes les plus fréquentes et les plus importantes en pathologie aviaire. Causées par *E. coli* elles se développent surtout quand les conditions d'élevage sont mauvaises (surpopulations, stress, mauvaise ambiance d'élevage, niveau sanitaire déficient, alimentation de mauvaise qualité). Ce sont des maladies cosmopolites qui peuvent entraîner des mortalités, des baisses de performances et des saisies à l'abattoir. Les colibacilloses aviaires prennent des formes générales, avec une voie d'entrée respiratoire ou génitale. La plupart des colibacilloses sont des surinfections, à la suite d'infections virales ou bactériennes (BOISSIEU et GUERIN, 2008).

I.3.2 Historique

E. coli ou "colibacille" est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'Homme. Découverte en 1885 par Théodore Escherichia, c'est un coliforme fécal généralement commensal, non pathogène, vivant sur la peau et les muqueuses sans nuire l'hôte qui l'héberge. Plus de 95 % des souches d'*E. coli* ne sont pas dangereuses et nous en avons besoin pour vivre.

Théodore Escherichia, en observant la fréquence des diarrhées néonatales chez l'Homme, avait déjà posé la question de l'implication du colibacille dans les entérites. Après la seconde guerre mondiale, les connaissances ont convergé pour établir le concept de virulence de certaines souches d'*E. coli*.

Dans les années 1950, de nombreuses souches d'*E. coli* ont été incriminées en tant qu'agent étiologique de diarrhées infantiles chez l'Homme et des diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires, méningites, septicémies, etc chez l'animal (**CHAHED, 2007**).

I.3.3 Importance

L'importance économique se traduit par des mortalités, des contre performances des lots infectés, des troubles divers de la reproduction (chute de l'éclosabilité, retard de croissance, augmentation de la mortalité en coquille ou mortalité des poussins les premiers jours), et des coûts élevés de la prévention. On note une perte annuelle de 6 millions d'euros en Angleterre due à l'impact des colibacillooses aviaires (**STORDEUR et MAINIL, 2002**).

L'importance hygiénique n'est pas négligeable, car certains pathotypes d'*E. coli* comme les STEC susceptibles d'infecter l'Homme, peuvent être véhiculés par les volailles (**BOISSIEU et GUERIN, 2008**).

I.3.4 Epidémiologie analytique

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

E. coli est un hôte normal du tractus digestif des volailles. Il est donc disséminé par les fèces des oiseaux malades ou porteurs et les oiseaux peuvent être contaminés par diverses sources (oiseaux malades ou porteurs, rongeurs, des insectes, des oiseaux sauvages, l'eau, des poussières, l'environnement) (**BOISSIEU et GUERIN, 2008**).

Certains facteurs prédisposent les volailles à la maladie. Le jeune âge, le stress, un taux élevé d'ammoniac, une baisse de la température, des infections immunodéficientes et concomitantes, favorisent la colibacillose. Le plus souvent *E. coli est* plutôt considéré comme un agent de surinfection (**LEDOUX, 2003**).

Dès que la résistance d'un oiseau est affaiblie, les souches pathogènes ou non peuvent se développer. Certaines souches pathogènes peuvent aussi infecter l'oiseau non affaibli. La

contamination se fait essentiellement par voie aérienne par des aérosols. Les bactéries sont inhalées et contaminent les sacs aériens. Ces derniers peuvent prolonger l'infection aux organes génitaux par contact. Certains *E. coli* intestinaux provoquent des infections générales après la forme entérique. De même, les œufs peuvent se contaminer en surface lors du passage dans le cloaque ou dans la litière souillée.

Les jeunes oiseaux sont plus sensibles à la forme septicémique. La dermatite est favorisée par des érosions cutanées et par une litière en mauvais état. L'omphalite est induite par la contamination fécale des œufs, par des œufs infectés brisés, par une salpingite ou une ovarite concomitante chez la mère.

Les formes génitales se rencontrent chez les futures reproductrices avant l'entrée en ponte ou sur les adultes avec ou sans signes respiratoires. Les formes respiratoires sont surtout rencontrées sur les jeunes, principalement en surinfection.

I.3.5 Etude clinique

Les colibacilloses aviaires se manifestent par des formes cliniques multiples et variées.

I.3.5.1 La colisepticémie et les colibacilloses respiratoires

La colisepticémie et les colibacilloses respiratoires représentent une dominante pathologique chez les poulets de chair élevés industriellement. Elles se présentent souvent chez les animaux de 6 à 10 semaines comme une complication d'une infection mycoplasmique ou virale (la bronchite infectieuse, la maladie de Gumboro, la maladie de Newcastle) survenue dans les deux ou trois premières semaines de vie, les conditions d'ambiance jouant un rôle déterminant dans l'apparition et la gravité du processus (**LECONET, 1992**).

Dans la **colisepticémie**, *E. coli* est isolée d'une maladie infectieuse intense ressemblant à la fièvre typhoïde et au choléra chez des poulets et des dindes adultes.

Les oiseaux affectés sont en bon état général et ont le jabot plein, ce qui indique la nature aiguë de l'infection (**JEFFREY et al., 2002**).

On constate une morbidité et une mortalité (subite) variables. Les lésions sont non exsudatives aux stades très précoces. Le foie est hypertrophié, avec quelques zones de dégénérescence. La rate est hypertrophiée avec des foyers de nécrose. On observe des lésions inflammatoires multiples (péricardite, périhépatite, aérosacculite, pneumonie, infection du sac

vitellin, arthrite, ostéomyélite, ténosynovite, etc...) (**Figure 3**) (**BOISSIEU et GUERIN, 2008**)



Figure 3 : Colisepticémie : carcasse rouge, foie dégénéré et aspect luisant
Source : Villate, 2001

Les colibacilloses respiratoires se distinguent en :

❖ **Colibacillose respiratoire chronique** : communément appelée maladie des sacs aériens, elle apparaît principalement chez les poulets âgés de 5 à 12 semaines avec un pic entre 6-9 semaines. Les oiseaux malades sont prostrés, anorexiques et présentent des symptômes respiratoires non spécifiques (éternuements, râles, toux, jetage, larmoiments, sinusite). L'extension de l'infection (aérosacculite) provoque des lésions fibrineuses des séreuses (péricardite et périhépatite) (**Figure 4**).

Selon une étude réalisée dans les abattoirs anglais, 43% des carcasses saisies pour cause de maladie présentaient des lésions de péricardite, de périhépatite et d'aérosacculite typiques de la colibacillose (**STORDEUR et MAINIL, 2002**).



Figure 4 : Colibacillose aviaire. Péricardite et périhépatite fibrineuses aiguës
Source : Villate, 2001

❖ **Syndrome de la grosse tête** : Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1978 en Afrique du Sud, puis dans de nombreux autres pays et montre de grandes similitudes avec la rhinotrachéite infectieuse de la dinde (**CHARAF, 2009**). La maladie apparaît vers l'âge de 30 semaines et se traduit par un retard de croissance, un œdème de la tête et de la région périorbitaire et un exsudat caséux dans le tissu conjonctif et au niveau des glandes lacrymales.

I.3.5.2 Ovarites et salpingites chez l'adulte

Les formes génitales observées chez les poulettes de 4 à 13 semaines ou chez les adultes se traduisent par des chutes de ponte survenant en particulier au 2-3ème mois de ponte, des morts subites ou des diarrhées blanches. L'autopsie révèle des lésions d'ovario-salpingite et de péritonite (**Figure 5**). Quand le sac abdominal gauche est infecté par *E. coli*, de nombreuses femelles développent une salpingite chronique caractérisée par une importante masse caséuse au niveau d'une zone dilatée de l'oviducte à paroi amincie. La taille de la masse caséuse peut augmenter avec le temps. Une péritonite, caractérisée par une mortalité intense, de la fibrine et la présence d'un jaune d'œuf libre dans la cavité abdominale, sont observés parfois suite à la ponte intra abdominale d'un ovule infecté. Les pondeuses infectées meurent fréquemment au cours des 6 premiers mois suivant l'infection; celles qui survivent pondent rarement des oeufs.

Cette forme génitale de l'infection provoque chez le poussin des mortalités embryonnaires (15 à 20%), des mortalités en coquille (3 à 5%) et des mortinatalités (10 à 20%) (**GROSS, 1991 et LECOANET, 1992**).

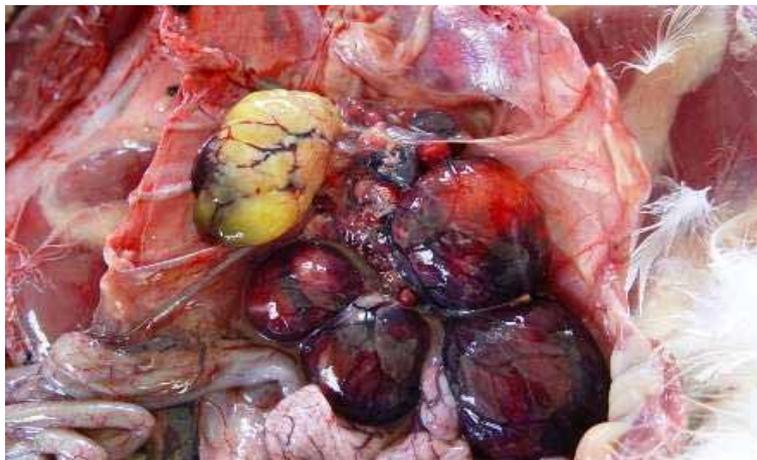


Figure 5 : Infection colibacillaire de la grappe ovarienne accompagnée d'une salpingite (Aspect cuit des ovules)

Source : BOISSIEU et GUERIN, 2008

I.3.5.3 Mortalité embryonnaire et mortinatalité

Cette expression de la colibacillose constitue probablement avec les erreurs d'élevage, la cause la plus importante de mortalité chez les poussins âgés de moins d'une semaine. La contamination de l'œuf et plus précisément de la membrane vitelline, se fait essentiellement lors de la ponte, au passage de celui-ci par le cloaque. Les bactéries alors présentes dans les matières fécales de la poule viennent se déposer à la surface de l'œuf. Ensuite, celles-ci pénètrent à travers les membranes coquillières et vont contaminer la membrane vitelline (**STORDEUR et MAINIL, 2002**).

Les poulets éclos d'œufs contaminés par *E. coli* présentent souvent une inflammation de l'ombilic (omphalite) et la mortalité peut être importante. Les lésions correspondent à l'altération du sac vitellin dont le contenu va du jaune brun au vert avec une consistance aqueuse à grumeleuse. Les poulets ou la volaille survivant plus de 4 jours peuvent présenter une péricardite, preuve de la diffusion systémique depuis le sac vitellin. Mais il est possible de n'avoir aucune mortalité, les seules manifestations de l'infection du vitellus étant la rétention du sac infecté et la réduction du gain de poids (**GROSS, 1991**).

I.3.5.4 Formes rares

Parmi les formes rares, on peut noter l'infection synoviale, la panophtalmie, l'entérite, la dermatite à *E. coli* mais aussi la maladie de Hjarre (ou coligranulomatose) qui est une forme particulière se manifestant par des nodules blanchâtres dans plusieurs organes (le long des intestins, dans le mésentère, dans le foie), sauf dans la rate. On observe aussi des cylindres caséux dans les caeca et cet aspect est similaire à celui de l'histomonose ou de la coccidiose caecale). La mortalité peut être élevée (**BOISSIEU et GUERIN, 2008**).

I.3.6 Diagnostic

I.3.6.1 Diagnostic clinique

On suspectera une colibacillose lors d'omphalite chez les jeunes ou suite à l'apparition de salpingite ou de la forme respiratoire chez les adultes.

A l'autopsie, on peut noter divers aspects lésionnels macroscopiques (ascite, aérosacculite, périhépatite, péricardite, péritonite, ovarite, salpingite et un aspect cuit des ovules d'odeur nauséabonde chez les adultes en ponte (**NDIAYE, 2010**). Il faut cependant garder à l'esprit que ces lésions peuvent aussi être engendrées par d'autres agents pathogènes.

I.3.6.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel se fait avec les pathologies digestives et respiratoires des oiseaux comme la pasteurellose, la salmonellose, le coryza infectieux, la variole aviaire, les mycoplasmoses et la tuberculose dans le cas de la maladie de Hjärre.

I.3.6.3 Diagnostic de laboratoire

Il est réalisé par l'isolement et l'identification de colibacilles pathogènes. Le sérotypage de l'isolat est nécessaire, mais ne permet pas toujours de conclure sur la pathogénicité de la souche identifiée (**BOISSIEU et GUERIN, 2008**).

L'appartenance à des sérotypes reconnus comme pathogènes (O1, O2 et O78) et la présence d'un certain nombre de facteurs de virulence bien définis (fimbriae P, l'aérobactine et la protéine Tsh) permettront de confirmer le diagnostic. La sérotypie et la recherche du système de l'aérobactine peuvent être réalisées par des méthodes immunologiques. Les autres facteurs de virulence étant recherchés par des méthodes de biologie moléculaire telles que la PCR ou l'hybridation sur colonies (**STORDEUR et MAINIL, 2002**).

I.3.7 Moyens de lutte

I.3.7.1 Prophylaxie

I.3.7.1.1 Prophylaxie sanitaire

Elle vise à contrôler les contaminations environnementales, les vecteurs animés ou inanimés, afin de réduire au minimum les facteurs prédisposant aux infections respiratoires. Une des méthodes consiste à réduire et à mieux contrôler les contaminations fécales par des sérogroupes pathogènes par exemple, en réduisant la transmission des *E. coli* de la poule au poussin par une fumigation des œufs dans les 2 heures qui suivent la ponte, en les récoltant le plus vite possible après la ponte et en écartant ceux en mauvais état ou présentant des souillures fécales à leur surface (**GROSS, 1994**).

La qualité de l'eau de boisson est aussi très importante, et il faut dès lors veiller à la renouveler très régulièrement. Des mesures générales de séparation des animaux par classes d'âge et par espèce, de nettoyage, de désinfection et de vide sanitaire entre chaque lot sont aussi des mesures de prévention indispensables dans le cadre de la lutte contre la colibacillose (**JORDAN et PATTISSON, 1996**).

1.3.7.1.2 Prophylaxie médicale

Etant donné le peu de connaissances et l'énorme diversité des souches d'*E. coli* aviaires en matière de facteurs de virulence, aucun vaccin n'est disponible à l'heure actuelle pour lutter efficacement contre les colibacilloses aviaires. En conséquence, l'antibiothérapie basée sur un diagnostic précis et un antibiogramme ainsi que la prophylaxie, restent encore les seuls moyens de lutte contre cette maladie malgré l'incidence croissante des résistances et le risque accru de sa transmission à l'homme (**MAINIL, 2003**).

1.3.7.2 Traitement

A l'heure actuelle, le traitement repose encore essentiellement sur l'antibiothérapie. Toutefois, il faut rester prudent quant à l'utilisation des antibiotiques car des études récentes menées sur une collection de 1600 souches d'*E. coli*, ont montré que le nombre de souches résistantes à divers antibiotiques allait en s'accroissant; il est donc plus que jamais nécessaire de réaliser un antibiogramme avant ou en parallèle à l'antibiothérapie. Des traitements alternatifs aux antibiotiques existent comme l'emploi de l'acide ascorbique qui contribue à intensifier l'activité des phagocytes (**STORDEUR et MANIL, 2002**).

Si le choix est possible, il est préférable d'utiliser des molécules comme les quinolones par voie orale (acide nalixidique, acide oxolinique, fluméquine, enrofloxacin), les lincosamides par voie orale, les aminosides par voie parentérale, les bêtalactamines par voie orale, les tétracyclines. Il faut cependant faire attention à certains antibiotiques, comme les aminosides, la colistine, la spectinomycine ou la framycétine, qui ne franchissent pas la barrière intestinale donc inactifs lors des colibacilloses systémiques s'ils sont administrés par voie orale (**BOISSIEU et GUERIN, 2008**).

Cependant, ils peuvent être employés lors de colibacilloses respiratoires ou intestinales (**WIDMANN, 2008**).

Les molécules les plus utilisées sur le terrain par les cliniciens de la zone d'étude sont les quinolones de deuxième et troisième génération par voie orale (fluméquine, enrofloxacin, norfloxacin), les bêtalactamines de synthèse par voie orale, les tétracyclines pures et les aminocyclitols (néomycine). Un traitement adjuvant est pratiqué par les aviculteurs et consiste à déparasiter les volailles et à faire une supplémentation en acides aminés, en minéraux, en oligo-éléments et en vitamines dans l'aliment ou dans l'eau de boisson surtout juste après le traitement anti-infectieux pour diminuer le stress et faciliter la résorption des produits. La

chimio-prévention est aussi pratiquée par certains aviculteurs en additionnant des antibiotiques dans l'eau de boisson ou dans l'aliment (NDIAYE, 2010).

I.5 Colibacilloses aviaires et santé publique

Selon BAUCHART *et al.* (2010) sur le plan épidémiologique et moléculaire, il n'y a pas de différence nette entre les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) humains et les APEC. A côté des effets spécifiques de la souche, le comportement commun de ces deux souches à la température du corps humain ou aviaire soutient l'idée d'un risque potentiel zoonotique des APEC et de certaines souches d'ExPEC humains.

Les APEC chez la volaille et les *E. coli* uropathogènes (UPEC) chez les humains sont les deux pathotypes du groupe ExPEC causant fréquemment des maladies extra-intestinales. Leur capacité à causer des maladies est en rapport avec la possession d'un contenu similaire de gènes de virulence et la capacité de provoquer une maladie. Par conséquent, il semble raisonnable que les UPEC et les APEC puissent développer des aptitudes pour un style de vie extra-intestinale chez l'Homme, ce qui leur permet de provoquer une maladie extra-intestinale chez des êtres humains (KYLIE *et al.*, 2005)

Certaines souches d'*E. coli* comme les STEC susceptibles d'infecter l'homme peuvent être véhiculés par les volailles. Cependant des toxi-infections alimentaires dues à *E. coli* O157:H7 et autres STEC mettant en cause la viande de volailles ou des produits à base d'œufs n'ont jamais été rapportées à ce jour (AFSSA, 2003).

L'antibiothérapie préventive des volailles favorise la pression de sélection de souches multirésistantes. Les usages d'antibiotiques devront donc toujours être raisonnés pour utiliser des antibiotiques auxquels l'isolat bactérien visé est sensible et selon un schéma posologique (voie, dose et durée de traitement) approprié. L'usage de fluoroquinolones devrait être réservé aux traitements en 2ème intention, ou en situation d'échec thérapeutique (BOISSIEU *et GUERIN*, 2008).

Chapitre II : LES CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES ASSOCIEES AUX *ESCHERICHIA COLI*.

II.1 Présentation de la bactérie

II.1.1 Caractères généraux des entérobactéries

Les entérobactéries sont une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie. Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*), soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp*).

La famille des entérobactéries se définit par les caractères suivants :

- bacilles à Gram négatif (2 à 4 microns de long sur 0,4 à 0,6 microns de large),
- mobiles avec ciliature péritriche ou immobiles,
- poussant sur milieux de culture ordinaires,
- aérobies - anaérobies facultatifs,
- fermentant le glucose avec ou sans production de gaz,
- réduisant les nitrates en nitrites,
- oxydase négatif.

Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques spécifiques, permettant de les différencier (MONTET, 2009).

Au sein de chaque genre, on individualise des espèces, par l'étude des caractères biochimiques ou antigéniques. Les entérobactéries possèdent toutes des antigènes de paroi (« somatiques ») ou antigènes O. Les entérobactéries mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelle (« Flagellaires ») ou antigènes H. Enfin, certains possèdent un antigène capsulaire ou antigène K.

II.1.2 L'espèce *Escherichia coli*

E. coli ou "colibacille" est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'Homme. C'est un coliforme fécal généralement commensal, non pathogène, vivant sur la peau et les muqueuses sans nuire l'hôte qui l'héberge. Son nom actuel a cependant été proposé en 1919 pour reclasser une espèce préalablement connue sous les noms de

« *Bacterium coli commune* », de « *Bacillus coli* » ou de « *Bacterium coli* ». Sa classification est la suivante :

- **règne** : *Procaryotae*
- **domaine** : *Bacteria*
- **phylum** : *Proteobacteria*
- **classe** : *Gammaproteobacteria*
- **ordre** : *Enterobacteriales*
- **famille** : *Enterobacteriaceae*
- **genre** : *Escherichia*
- **espèce** : *Escherichia coli*

II.1.2.1 Caractères cultureux

E. coli pousse sur milieu ordinaire à une température optimale de 37°C. Incubées 24 heures sur gélose agar à 37°C, les colonies sont convexes, lisses et incolores. Elles ont en général un diamètre compris entre 1 et 3 mm avec une structure granulaire et une marge intacte. La surface est brillante et la consistance gluante.

II.1.2.2 Caractères biochimiques

Les *E. coli* sont rouge de méthyle (+), désaminase (-), VP (-), lactose (+), ONPG (+), mannitol (+), Indole (+++), uréase (-), acétoïne (-), citrate (-), H₂S (-), gaz (+), saccharose (+), salicine (+) et LDC (+).

II. 1.2.3 Morphologie

E. coli est un bacille, donc de forme cylindrique (bâtonnets) ou coccobacillaire, gram négatif uniformément coloré, non sporulé, de 2µm à 3µm de long sur 0.7µm de large. Il se présente soit seul ou groupé le plus souvent par deux (diplobacilles), très rarement ils sont rencontrés en amas. Ils sont mobiles grâce à une ciliature péritriche (**Figure 6**).

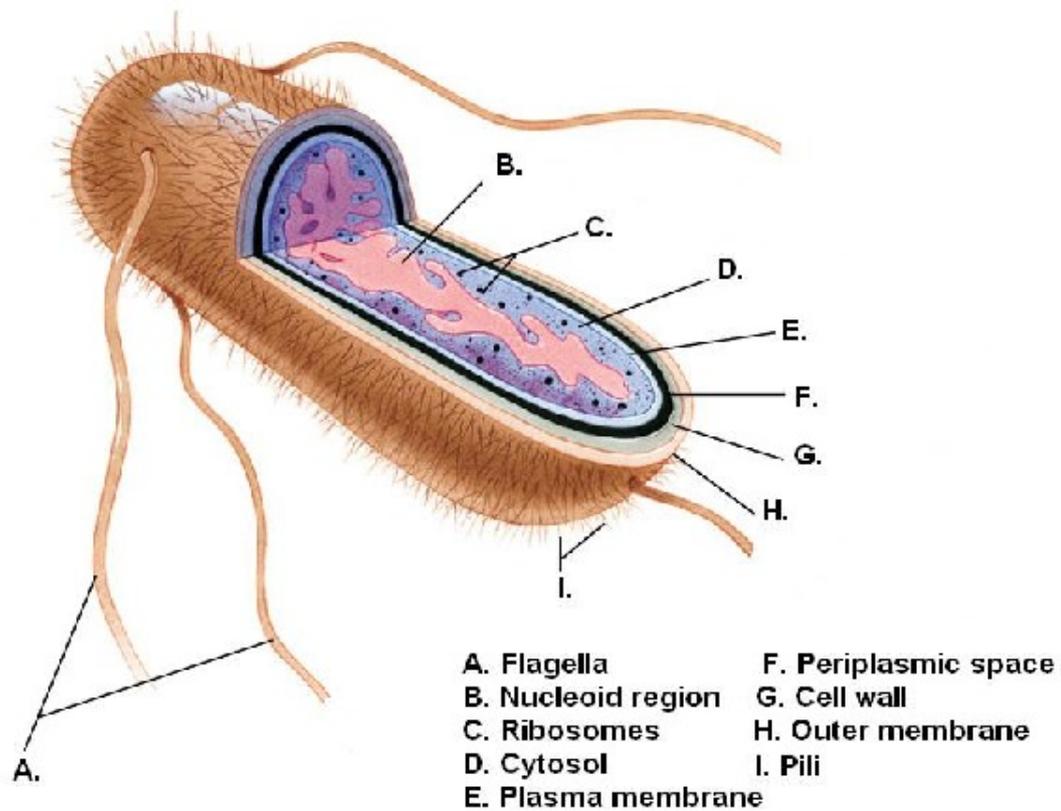


Figure 6: Morphologie et structure de la bactérie *E. coli*

Source : http://healthdefine.com/wp-content/uploads/2011/06/E_COLI_bacteria.jpg

II.1.2.4 Structure

Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant majeur de la surface externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS est composé de trois entités synthétisées séparément : le lipide A, le noyau ou core et l'antigène O, qui seront, par après, assemblées l'une à l'autre. Le lipide A, enchâssé dans la membrane externe, représente la partie proximale du LPS, le noyau, sa partie médiane, et l'antigène O, sa partie distale « libre » dans le milieu extérieur (**Figure 7**). Chez les entérobactéries, le lipide A est fortement conservé et le noyau est très peu variable tandis que l'antigène O est la région hypervariable. Plusieurs activités biologiques ont été associées aux LPS, parmi lesquelles l'activité endotoxinique portée par le lipide A et la spécificité antigénique de la souche bactérienne portée par l'antigène O (**SZALO et al., 2006**).

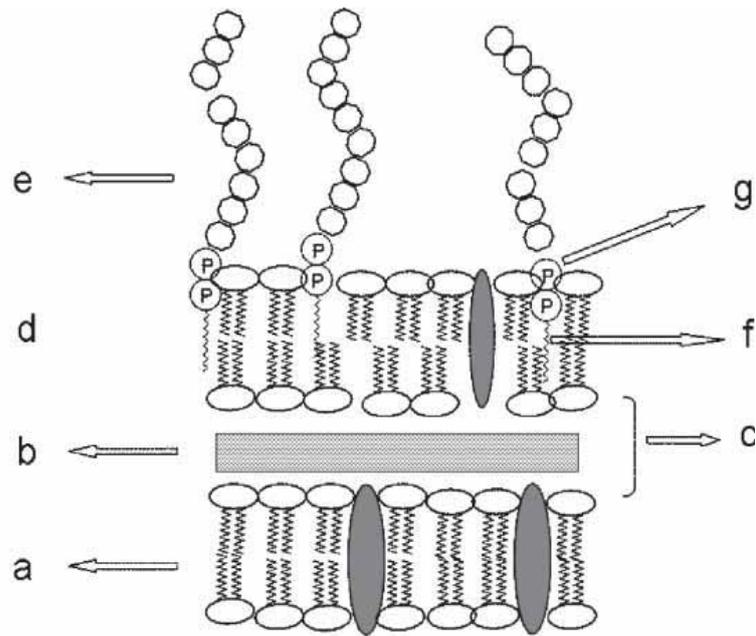


Figure 7: structure de la membrane des bactéries à Gram négatif

Source : SZALO et al, 2006

- a – la membrane cytoplasmique
- b – la couche de peptidoglycane (plus épaisse chez les bactéries à Gram positif)
- c – l'espace périplasmique (présente uniquement chez les bactéries à Gram négatif)
- d – la membrane externe (présente uniquement chez les bactéries à Gram négatif)
- e – l'antigène O ou lipopolysaccharide (LPS) ou chaînes latérales osidiques.
- f – le lipide A
- g – le core

II.1.2.5 Structure antigénique

Les principaux antigènes des *Escherichia coli* sont :

✓ Les antigènes O

Ils possèdent une composition lipopolysaccharidiques qui longtemps a permis la caractérisation des *E. coli* par des tests sérologiques. Des méthodes de sérotypage moléculaire sont actuellement développées. Elles reposent sur l'analyse de la diversité des antigènes O par électrophorèse. Le profil trouvé sera ensuite analysé à l'aide de logiciels et sera comparé à une base de données, en perpétuel développement. L'antigène O est déterminé par amplification de groupes de gènes *rfb* (replication fork barrier).

✓ **Les antigènes H**

Ils sont très difficiles à mettre en évidence. La diversité des antigènes H est due aux différents types de flagelline (la composante essentielle du flagelle). Le typage de l'antigène H peut se faire par séro-agglutination, mais cette technique n'est pas très développée. Des techniques moléculaires de sérotypage sont actuellement développées. Elles reposent sur l'amplification et la restriction du gène *fliC* (C flagellin).

✓ **Les antigènes K**

Trois types d'antigènes K méritent actuellement une étude à part et il s'agit plus spécialement des antigènes K qui sont désignés par les lettres **L**, **A** et **B**.

- **L'antigène L** est le plus fréquent, c'est un antigène de surface. Il est thermolabile (détruit en 30 minutes à 100°C). Le chauffage par conséquent va provoquer une perte du pouvoir antigénique.
- **L'Antigène A** est beaucoup plus rare ; c'est un antigène capsulaire, rencontré chez les *E. coli* responsables d'infections urinaires. Il est thermostable et n'est détruit que par autoclavage.
- **L'Antigène B** est rencontré chez les souches d'*E. coli* responsables de gastro-entérite infantile. Il est thermolabile et détruit en 30 mn à 100°C.

II.1.2.6 Pouvoir pathogène

L'étude des facteurs de pathogénicité des *E. coli* a montré que dans l'espèce, il existe de nombreuses variantes exprimant des potentialités pathogènes diverses : les pathovars ou pathotypes.

Les facteurs de pathogénicité sont :

- ✓ **Une capsule** qui s'oppose à la phagocytose.
- ✓ **Des protéines** de la membrane externe et le LPS donnant aux bactéries la capacité d'échapper à l'activité bactéricide du sérum de l'hôte en s'opposant à la fixation du complément.
- ✓ **Des systèmes de captation du fer** (les sidérophores), fournissant aux bactéries le fer indispensable à leur multiplication.

- ✓ **Des adhésines** qui confèrent aux souches qui les possèdent la propriété de se fixer aux cellules épithéliales.
- ✓ **Des toxines** :
 - **l'endotoxine** commune aux entérobactéries ;
 - **les entérotoxines** : ST (thermostables) et LT (thermolabiles) ;
 - **les cytotoxines** SLT1 et SLT2 (Shiga-like toxin) ;
 - **l'hémolysine**

II.1.2.7 Pouvoir immunogène

E. coli possède un pouvoir immunogène faible car les animaux guéris peuvent faire une rechute à l'occasion d'un contact avec les fèces contaminés. Il n'y a pas encore de vaccin disponible sur le marché (NDIAYE, 2010).

II.2 Principaux pathotypes et sérotypes associés aux *E. coli* pathogènes

II.2.1 *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC)

Les Souches entérotoxigènes parmi lesquelles on rencontre les sérotypes O6, O8, O15, O20, O25, O63, O78 O80, O85, O115, O128, O139 sont responsables de la "diarrhée des voyageurs" ou "turista" et de syndromes diarrhéiques épidémiques dans les pays du tiers-monde. Elles se fixent sur la muqueuse par des pili et élaborent les entérotoxines thermolabile (LT) et thermostable (ST). Ces facteurs de virulence sont codés par les plasmides. Cette infection se caractérise par une diarrhée très liquide, des nausées, des crampes abdominales associées ou non avec une légère fièvre.

Les souches ETEC sont aussi responsables de cas de diarrhées sévères chez les animaux. Elles affectent principalement les veaux et les porcs. D'ailleurs, les ETEC sont la principale cause de diarrhée post-sevrage chez les porcs, responsables d'environ 2 à 5 % de mortalité, et nécessitant des traitements aux antibiotiques dans 20 à 50 % des porcs après sevrage (NAGY et FEKETE, 2005).

II.2.2 *Escherichia coli* producteur de lésions de type attachant et effaçant (AEEC)

Les *E. coli* de type attachant et effaçant (AEEC), comprennent les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et certains *E. coli* producteurs de toxines Shiga (STEC), dont ceux de sérotype O157:H7. Les AEEC sont responsables du développement de lésions intestinales appelées lésions d'attachement et d'effacement (A/E), caractérisées par l'adhérence intime de la

bactérie à la cellule épithéliale intestinale, l'effacement de la bordure en brosse, le réarrangement du cytosquelette de la cellule infectée, et la formation d'une structure en piédestal formée de diverses fibres du cytosquelette dont l'actine (GIRARD, 2005).

II.2.3 *Escherichia coli* uropathogène (UPEC)

Les souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC) se différencient des souches retrouvées dans la flore commensale chez l'hôte normal par la présence de facteurs de virulence et l'association à certains sérotypes : O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 et O75. Ils sont principalement responsables de cystites et de pyélonéphrites chez l'homme et d'autres espèces dont le chien et le porc, de bactériémies et de septicémies chez l'homme et le porc, de méningites néonatales pouvant entraîner la mort, de même que d'infections intra abdominales et de pneumonies nosocomiales.

II.2.4 *Escherichia coli* à adhérence diffuse (DAEC)

Ces souches, tout d'abord classées avec les *E. coli* entéro-pathogènes, forment maintenant un groupe à part, du fait de leur phénotype d'adhésion particulier qui n'implique pas d'agrégats microbiens. Les DAEC représentent la classe d'*E. coli* la moins bien connue parmi celles amenant des désordres intestinaux chez l'humain. Jusqu'à présent, seul le séro-groupe O126 a été associé aux DAEC chez l'humain (NATARO et KAPER, 1998).

Les souches DAEC sont caractérisées par leur mode d'adhésion aux cellules épithéliales dit « d'adhésion diffuse ». La plupart des souches DAEC adhèrent aux cellules intestinales grâce à des adhésines fimbriaires et sont capables de produire sur les cellules cibles un effet cytopathique caractérisé par la formation de grandes extensions cellulaires qui s'enroulent autour de la bactérie. D'autres facteurs de virulence pourraient également être impliqués dans le pouvoir pathogène, en particulier en induisant une inflammation intestinale (LOUKIADIS, 2007).

Certaines souches, aux propriétés invasives, sont impliquées dans des infections du tractus urinaire, aiguës et chroniques alors que d'autres semblent impliquées dans le déclenchement de diarrhées chez les enfants âgés de 1 à 5 ans (KERN-BERNAIBOUT, 2006).

II.2.5 *Escherichia coli* producteur de toxine Shiga (STEC)

Les STEC sont caractérisées par leur capacité à produire une ou plusieurs toxines Shiga (Stx), anciennement appelées vérotoxines (VT), ou Shiga-like toxins (SLT)). Les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections à STEC sont O26, O55, O111, O113, O117 et

O157 chez l'Homme, O138, O139 et O141 chez le porc lors de cas de maladie de l'œdème, et O5, O8, O20, O26, O103, O111, O118 et O145 dans les cas de dysenterie chez le bovin et le mouton (**GYLES et FAIRBROTHER, 2004**).

Ces vingt dernières années, les connaissances sur la complexité de l'épidémiologie et de l'écologie de ce pathogène ont évolué. Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources d'infections à STEC.

Ainsi, il paraît évident que *E. coli* O157:H7 (EHEC), et plus généralement les STEC, peuvent se transmettre du réservoir animal à l'Homme via les denrées alimentaires, l'eau, l'environnement et les contacts directs avec les animaux (**GIRARD, 2005**).

II.2.6 *Escherichia coli* extra-intestinal (ExPEC)

Les *E. coli* pathogènes à tropisme extra intestinal (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) sont responsables d'infections extra-intestinales dont la porte d'entrée se situe soit au niveau de l'intestin, soit au niveau d'autres sites divers (plaies, appareil respiratoire, etc.). Ces bactéries ont développé des stratégies leur permettant de survivre et de se multiplier en milieux hostiles, pauvres en fer, et en présence des divers mécanismes de défense immunitaires de l'hôte. Les ExPEC tels que les UPEC sont principalement responsables d'infections urinaires (cystites et de pyélonéphrites) principalement chez l'homme et d'autres espèces, dont le chien et le porc, de bactériémies et de septicémies chez l'Homme et le porc, de méningites néo-natales pouvant entraîner la mort, de même que d'infections intra-abdominales et de pneumonies nosocomiales.

Les ExPEC incluent aussi les *E. coli* pathogènes aviaires (avian pathogenic *E. coli*, APEC), responsables de cas de septicémie, de cellulite et d'aérosaculite chez la volaille.

La majorité des ExPEC appartient à des groupes phylogéniques et à des sérogroupes O restreints (**JOHNSON et RUSSO, 2002**). Les sérotypes associés aux APEC sont les sérotypes O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109, O115.

Pour des raisons économiques et hygiéniques, notre travail portera sur les recherches des gènes de virulence des ExPEC et des STEC. En effet, les ExPEC sont le groupe d'E. coli auquel appartiennent les APEC (pathotype responsable des colibacillooses aviaires) et les STEC sont le pathotype le plus virulent pour l'Homme et pour lequel les volailles peuvent être des hôtes réservoir (FAIRBROTHER et NADEAU, 2006).

II.3 Facteurs et gènes de virulence associés aux ExPEC aviaires (APEC)

II.3.1 Adhésines

On y retrouve des facteurs de virulence tel que :

- **le P fimbriae** : Il intervient dans le mécanisme d'adhésion aux cellules épithéliales dans les voies urinaires et est codé par le gène *pap* (pyelonephritis-associated *pili*).
- **Le fimbriae de type 1** : codé par le gène *fim* il confère aux bactéries la capacité d'agglutiner une large variété de globules rouges (cheval, poule, cobaye, etc.). Il est impliqué dans la colonisation initiale du tractus respiratoire supérieur des oiseaux.
- **Le S fimbriae** : codé par le gène *sfa* (S-family adhesions), il est capable de promouvoir l'adhésion d'*E. coli* aux cellules endothéliales et épithéliales du plexus choroïde et du ventricule cérébral chez l'homme. Ce type de fimbriae a rarement été détecté dans les APEC.
- **Le F1C fimbriae** : permet à la bactérie de reconnaître et de se fixer sur les cellules épithéliales (tubules rénaux distaux et les tubes collecteurs) et endothéliales (vessie et des reins).
- **L'hémagglutinine sensible à la température** : codé par le gène *tsh* (Temperature Sensitive Hemagglutinin). Son rôle serait de stimuler la réponse inflammatoire avec le dépôt de fibrine et le développement de lésions à hauteur des sacs aériens (MANIL et VAN BOST, 2004).

II.3.2 Capsule

Les capsules polysaccharidiques (antigènes « K ») sont sécrétées à la surface de certaines souches d'*E. coli* pathogènes principalement celles causant des affections extra-intestinales. Les capsules sont des facteurs de virulence majeurs, elles permettent à la bactérie d'évader le système immunitaire pendant la phase d'infection (CUEVAS RAMOS, 2010).

II.3.3 Aéro bactéine

C'est un système de captation efficace du fer permettant aux bactéries qui le possèdent de survivre en présence de faibles concentrations en fer et par la même occasion de se multiplier dans le sang ou les organes internes. Chez *E. coli*, la synthèse de ce sidérophore est régie par les gènes *iuc* (iron uptake chelate) *A,B,C,D,E* (HUCHE, 2006).

L'aéro bactéine fixe des ions Fe^{+++} qu'elle libère après fixation sur un récepteur de la membrane externe. Elle est ensuite recyclée et le fer gagne la membrane cytoplasmique par un système de transport actif encore mal connu (KERN-BENAIBOUT, 2006).

II.3.4 Cytotoxines

Chez les APEC, on retrouve les toxines comme l'hémolysine codée par le gène *hly* et la cytotoxine nécrosante codée par le gène *cnf* dont l'effet est de favoriser le franchissement de la barrière épithéliale par les colibacilles. Ces *E. coli*, de découverte plus récente par rapport aux souches vérotoxino gènes, produisent une toxine CNF 1 ou CNF 2 qui provoque un effet de multinucléation des cellules en cultures et une réaction nécrotique dans la peau d'où leur nom Cytotoxic Necrotizing Factor. Les deux toxines diffèrent par leurs propriétés biologiques et par leurs caractéristiques immuno chimiques.

II.4 Facteurs et gènes de virulence associés aux STEC

II.4.1 Shigatoxines

Toutes les souches STEC se caractérisent par la production de Shiga toxines (Stx). Elles se distinguent par leurs propriétés immunologiques mais leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. Stx2 est une toxine plus puissante que Stx1. Après avoir traversé l'épithélium intestinal, les toxines seraient capables de diffuser par voie systémique et d'être véhiculées jusqu'aux organes cibles par la circulation sanguine, soit via les globules rouges, soit par l'intermédiaire des polynucléaires.

Les toxines Stx sont codées par des bactériophages et sont responsables de lésions de l'endothélium vasculaire, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral, à l'origine de colite hémorragique et d'une insuffisance rénale sévère, le syndrome hémolytique et urémique (LOUKIADIS, 2007).

II.4.2 Facteurs d'adhésion, d'attachement et d'effacement

La colonisation du tube digestif par certaines souches STEC s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum. Les lésions A/E, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal dans la zone de contact entre la bactérie et la cellule cible. Les lésions provoquées par le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales, en diminuant la surface d'absorption, pourraient entraîner les symptômes diarrhéiques observés lors des infections (AFSSA, 2003).

Les gènes *eae* (*Escherichia coli* attaching and effacing), *tir* (Translocated Intimin Receptor), *esp* (EPEC-secreted protein) nécessaires à la formation de lésions A/E sont situés sur le locus d'effacement des entérocytes (LEE).

II.4.3 Entérohémolysine

C'est une hémolysine appartenant à la famille des toxines RTX (Repeats in Toxin). Elle est codée par le gène *ehx* (entérohémolysine). Son mécanisme d'action serait lié à la libération de fer engendrée par les hématies lysées, ce qui permettrait un meilleur développement des bactéries (BERNARD, 2007).

II.5 Prévalence des facteurs et gènes de virulences et des sérotypes des *Escherichia coli* d'origine aviaire dans le monde

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

OH *et al.* (2011) ont trouvé dans deux fermes de poules pondeuses de la péninsule coréenne infectées par la colibacillose que sur un total de 17 isolats, tous possédaient le gène *iucD* et 82, 3% possédaient le gène *tsh*.

JANBEN *et al.* (2001) ont examiné 150 *E. coli* isolées de viscères de volailles mortes de colibacillose pour la présence de 17 gènes associés à la virulence par PCR. La plupart des souches (88,7%) ont donné des résultats positifs pour *tsh* (85,3%), et 30% des cas étaient positifs au gène *papC*.

Cent quatre (104) isolats d'*E. coli* avaient été recueillis à partir des tissus internes et le cloaque des poulets atteints de la colibacillose ou d'oiseaux sains. Les isolats ont été testés pour la présence des gènes *tsh*, *pap*, *pil* (F1 fimbriae), et *iuc* par hybridation ADN / ADN. Le virotype *tsh-pil-iuc* a été détecté dans 53,8% des isolats provenant de tissus internes. Le virotype *tsh-pap-iuc* a été détecté dans les des tissus internes à une fréquence inférieure (15,4%). Parmi ces gènes, *tsh* et *iuc* ont été détectées dans la plupart des isolats provenant des tissus internes (90,4% et 92,3%), comparativement à seulement 51,9% et 63,5% des isolats provenant du cloaque. Le gène *pap* a été détecté dans une moindre mesure, dans 25% des isolats des tissus internes (NGELEKA et al., 2002). Ces données suggèrent que les virotypes *tsh-pil-iuc* et *tsh-pap-iuc* ainsi que les gènes *iuc* et *tsh* sont des facteurs importants de la bactérie *E. coli* pathogène aviaire.

Ces auteurs ont également testés les échantillons pour les sérotypes O1, O2 et O78 et la recherche de l'antigène O a révélé que 25% des isolats appartenaient aux sérotypes O1 (4,8%), O2 (9,6%), et O78 (10,6%). La plupart des isolats de sérotype O2 provenant des tissus internes était associée au virotype *tsh-pil-iuc*, deux d'entre eux possédant également le gène *pap*. Un isolat provenant d'un oiseau malade de sérotype O2 associé au virotype *tsh-pap-pil-iuc* a également été trouvé. De même, la plupart des isolats de sérotype O78 provenant des tissus internes étaient associée au virotype *tsh-pil-iuc*, l'un d'entre eux possédant également le gène *pap*.

Concernant la présence des STEC dans les élevages de volailles, il existe très peu de travaux permettant de préciser la prévalence de ce pathogène.

Le bilan AFSSA (2003) rappelle que BEERY et al. (1985) ont mis en évidence la capacité des souches d'*E. coli* O157:H7 à coloniser le cæcum de poulets inoculés expérimentalement. Une étude publiée en 2005 montre que certaines souches d'*E. coli* O157 sont capables de persister, chez le poulet de 6 semaines, jusqu'à 156 jours après inoculation.

Une étude américaine menée par DOYLE et SCHOENI (1987) a permis de mettre en évidence le sérotype O157:H7 des STEC dans les carcasses de poulet : 4% des échantillons réalisés sur des carcasses crues (n=263) étaient contaminés par *E. coli* O157:H7.

En Inde, une étude portant sur 212 échantillons fécaux de 62 poules, 50 canards et de 100 pigeons et examinés par PCR multiplex, a établi la présence de *stx1* et *stx2* chez les pigeons et

EPEC chez la volaille. Les pigeons pourraient donc servir de vecteur de transmission des STEC à l'environnement et à l'Homme (**FAROOQ et al., 2009**).

Les dernières études réalisées montrent que les sérotypes les plus présents et les plus pathogènes sont les sérotypes O1, O2 et O78, représentant 15 à 61 % des souches isolées bien que d'autres soient aussi présents (**STORDEUR et MANIL, 2002**).

Une étude menée au Japon par **YAGUCHI et al. (2007)** présente les sérogroupes O1, O2 et O78 comme étant les plus fréquemment rencontrés car ayant été trouvés dans 56 des 125 (44,8%) souches de poulets malades grâce à des tests d'agglutination.

Pour les 2427 souches de colibacilles pour lesquelles un sérotypage a été réalisé, les données collectées par le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture) indiquent que 40,7 % étaient des souches non typables, 37,2 % étaient de type O78K80, 19,6 % de type O2K1 et 2,5 % de type O1K1 (**SOUILLARD et al., 2006**).

Chapitre III : RESISTANCE DES *ESCHERICHIA COLI* AUX ANTIBIOTIQUES

Une souche bactérienne est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement supérieure à celle qui inhibe la majorité des autres bactéries de la même espèce.

On distingue :

- **La résistance naturelle "ou innée"** : l'espèce est caractérisée par une insensibilité naturelle à un antibiotique particulier. Cela peut résulter de l'incapacité de l'antibiotique à pénétrer dans la cellule (paroi bactérienne imperméable) et à atteindre sa cible, d'un manque d'affinité entre l'antibiotique et son site d'action ou l'absence de cible cellulaire.

- **La résistance acquise** : l'espèce est normalement sensible à un antibiotique mais certaines souches expriment une résistance à un ou des antibiotique (s) donné (s) grâce à plusieurs mécanismes biochimiques. Elles sont donc capables de supporter une concentration d'antibiotique (s) qui normalement est suffisante pour inhiber et tuer des bactéries de la même espèce.

III.1 Mise en évidence (Antibiogramme)

L'antibiogramme permet de déterminer in vitro la sensibilité des souches bactériennes. C'est une méthode rapide, très utilisée et qui correspond à une mise en contact (dans une boîte de pétri contenant un milieu gélosé) de la souche bactérienne avec des disques imprégnés des différents antibiotiques supposés être efficaces sur la bactérie, d'après son spectre théorique de résistance. La diffusion des antibiotiques dans la gélose entraîne une inhibition de la culture de la bactérie plus ou moins importante selon les antibiotiques. On mesure le diamètre d'inhibition autour du disque, et on se réfère à des tables qui permettent de supposer que la souche sera : "sensible" ou "résistante" à l'antibiotique étudié, s'il est donné à doses habituelles, ou : "intermédiaire "c'est-à-dire sera "sensible" si on augmente les doses.

III.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

III.2.1 Mécanismes biochimiques

Les mécanismes biochimiques de résistance sont d'autant plus variés que les cibles des antibiotiques sont différentes (FLUIT et VISSER., 2001).

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques soit en se rendant imperméables à leur pénétration, soit en produisant des enzymes capables de les inactiver ou encore en modifiant la structure de leurs cibles.

III.2.1.1 Modification de la perméabilité de la membrane externe

La résistance par imperméabilité de l'enveloppe des bactéries est uniquement décrite chez les bactéries à Gram négatif, avec une membrane externe et des porines insérées dans cette enveloppe très hydrophobe et laissant passer des petites molécules hydrophiles. Il peut s'agir d'une diminution quantitative d'un ou plusieurs types de porines ou d'une modification de la structure d'une des porines essentielles et qui peut être à l'origine d'une résistance acquise aux bêta-lactamines, aux quinolones, au chloramphénicol, aux sulfamides, au triméthoprim et aux tétracyclines.

III.2.1.2 Modification de la cible ou substitution de la cible pour les sulfamides

La substitution de cible est un des mécanismes de résistance observés avec les sulfamides et le triméthoprim. Les bactéries produisent des enzymes chromosomiques sensibles et des enzymes plasmidiques résistantes. Une modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase ou de la dihydrofolate réductase confère, respectivement, une résistance aux sulfamides ou au triméthoprim.

III.2.1.3 Synthèse d'enzymes d'inactivation de l'antibiotique

Le mécanisme le plus courant de résistance aux β -lactames consiste dans la production, par les bactéries, d'enzymes hydrolysant l'antibiotique, appelés β -lactamases. Ces enzymes sont secrétés à l'intérieur dans le cas des Gram (+), mais maintenus dans l'espace périplasmique dans le cas des Gram (-). Il s'agit de protéases à sérine active, qui se lient aux β -lactames avec plus d'affinité que les lipopolysaccharides qui sont responsables de la biosynthèse de la paroi du peptidoglycane, essentielle au maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire en la protégeant des variations de pression osmotique (VAN BAMBEKE et TULKENS, 2008).

III.2.1.4 Efflux actif de l'antibiotique

L'efflux repose sur une pompe insérée dans la membrane interne et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal présent dans la membrane externe et grâce à une protéine de jonction périplasmique. Cet efflux conduit à une diminution de la

concentration intracellulaire de l'antibiotique et confère généralement des résistances à bas niveau. Ils s'exercent vis-à-vis de nombreux antibiotiques dont la cible d'action est intracellulaire (quinolones, chloramphénicol, macrolides, tétracyclines...) et ils sont qualifiés de pompes d'efflux multidrogues.

III.2.2 Mécanismes Génétiques

III.2.2.1 Supports génétiques de la résistance

III.2.2.1.1 Chromosomes

Comme tous les procaryotes, les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide desoxyribonucléique (ADN) qui est le support de l'information génétique. Les constituants de l'appareil nucléaire sont la cible d'action de plusieurs antibiotiques : les quinolones inhibent les topoisomérases et les rifamycines inhibent les ARN polymérases, tandis que les nitromidazolés entraînent la fragmentation de l'ADN chez les anaérobies stricts.

III.2.2.1.2 Plasmides

Les plasmides sont définis comme étant des structures d'ADN double brin, circulaire et autonome du chromosome bactérien par rapport à leur contrôle et leur répllication. Leur taille varie de quelques kilobases à quelques centaines de kilobases. Ils peuvent être transférés horizontalement par conjugaison ou mobilisation, entre bactéries de même espèce ou non. Ce sont les éléments du génome les plus mobiles (**KERN-BERNAIBOUT, 2006**). Le plasmide peut véhiculer la résistance à plusieurs antibiotiques à la fois.

III.2.2.1.3 Transposon

C'est un gène mobile, appelé gène « sautant », codant pour une résistance aux antibiotiques et qui possède des séquences d'insertion et la capacité de se transférer d'un plasmide vers le chromosome, d'un chromosome vers un autre chromosome ou d'un plasmide vers un autre plasmide. Il peut véhiculer plusieurs gènes de résistance. Il ne peut pas se répliquer mais code pour des éléments de transposition. La transposition étant un phénomène qui consiste à additionner des gènes de taille définie au sein du chromosome bactérien ou du plasmide.

III.2.2.1.4 Intégrons

Systèmes d'éléments génétiques capables d'acquérir ou de perdre des gènes. Ils ne se répliquent pas mais constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes.

Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique de site. Les intégrons sont véhiculés par un chromosome, un plasmide, ou un élément transposable.

III.2.2.2 Mécanismes d'acquisition de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut s'acquérir soit par mutation chromosomique qui est un changement spontané ou provoqué par un agent mutagène, soit par acquisition de matériel génétique exogène par l'intermédiaire d'un plasmide ou de transposons à la faveur de trois (3) mécanismes d'échange possibles que sont la conjugaison, la transformation ou la transduction.

III.3 Prévalence de la résistance des *Escherichia coli* aux antibiotiques dans le monde

CHASLUS-DANCLA, et al. (1979) ont montré que chez les volailles la résistance à la tétracycline est la plus fréquemment rencontrée. Pour 3 sondages sur 5, elle a été supérieure à 70% et a pu atteindre 100% des *E. coli* totaux de la flore intestinale chez la volaille atteinte de colibacilloses. La résistance à la streptomycine généralement rencontrée avec une fréquence inférieure, peut parfois être élevée (77%).

La résistance aux antibiotiques de 101 isolats d'*E. coli* pathogènes obtenus dans les fermes commerciales au Bangladesh a été déterminée par diffusion en gélose Mueller-Hinton par **HASSAN et al. (2011)**. Parmi 101 isolats pathogènes d'*E. coli*, plus de 55% étaient résistants à au moins un des composés testés, et 36,6% des isolats ont montré de multiples résistances aux médicaments. Les résistances les plus fréquemment observées étaient contre la tétracycline (45,5%), l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (26,7%), l'acide nalidixique (25,7%), l'ampicilline (25,7%), et la streptomycine (20,8%). Des résistances ont également été observées contre certains antibiotiques comme la ciprofloxacine (12,9%), le chlormaphénicol (8,9%), et la gentamicine (2%).

La majorité des données reçues par le Résapath (réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (France)) pour la filière avicole

concerne trois espèces: la dinde, le poulet (poules pondeuses et poulets de chair) et le canard et c'est dans la filière poulet que la résistance au ceftiofur est la plus élevée avec 6%. Parmi les antibiotiques les plus fréquemment testés dans les cas de résistance aux antibiotiques des *E. coli*, c'est vis-à-vis de la gentamicine que les *E. coli* isolés chez la volaille présentent le moins de résistance: 2% à 5% d'isolats résistants. La résistance aux fluoroquinolones est variable selon les différentes molécules de cette famille d'antibiotiques et l'espèce animale, allant de 7% pour l'enrofloxacin chez la dinde à 46% pour la difloxacin chez le poulet. Les résistances les plus marquées au sein de cette filière concernent la tétracycline, avec 80 à 85% d'isolats résistants. L'amoxicilline se place juste après, avec des niveaux atteignant plus de 50% de résistance (GAY et al., 2008).

JIANG et al. (2011) ont montré que sur un total de 592 souches d' *E. coli*, isolées chez les porcs et la volaille (animaux sains et malades) en Chine, testées pour la résistance à 22 antimicrobiens, les isolats d' *E. coli* avaient des taux élevés de résistance à l'ampicilline (99,5%), la doxycycline (95,6%), tétracycline (93,4%), triméthoprime-sulfaméthoxazole (74,3%), l'amoxicilline (65,1%), la streptomycine (54,7%), et le chloramphénicol (50,2%). La résistance aux céphalosporines, quinolones et les aminoglycosides a été également assez répandue. La majorité (81%) des isolats présentaient une multi-résistance aux antimicrobiens, le plus souvent à 5-6 différents types antimicrobiens. Un isolat était résistant à tous les 22 antimicrobiens.

Cette étude a été précédée par celle de WANG et al. (2010) qui ont montré que sur 148 isolats provenant de cas diagnostiqués de la colibacillose aviaire de la province du Guangdong (Chine) entre 2005 et 2008, la majorité des isolats affichaient une résistance à la tétracycline (97%), le sulfaméthoxazole (93%) et les fluoroquinolones (87% pour la ciprofloxacine et 84% pour l'enrofloxacin), le chloramphénicol (74%), et le florfenicol (66%).

NDIAYE, 2010 indiquait que 60% des cliniciens utilisaient les quinolones sur le terrain et avait obtenu dans ces travaux une fréquence de résistance de 31,48 % pour le fluméquine et 37,04% pour la norfloxacine.

La diminution de la sensibilité bactérienne par sélection de résistances acquises soulève de nombreuses préoccupations. Tout d'abord, la plupart des catégories de médicaments utilisés chez les animaux sont aussi utilisés chez les humains. Ensuite, certains antimicrobiens utilisés

chez les humains sont administrés couramment à un grand nombre d'animaux à des fins de traitement, à titre prophylactique ou comme stimulateur de croissance. Cette utilisation courante soulève une préoccupation concernant la résistance, à cause du nombre d'animaux concernés. En outre, les méthodes modernes de production imposent que même les traitements thérapeutiques de certains types d'animaux comportent nécessairement le traitement de groupes entiers d'animaux (métaphylaxie), par les aliments ou l'eau. Cela accroît effectivement l'exposition potentielle à la pression sélective de la résistance. Finalement, certains médicaments sont homologués pour deux ou plusieurs des catégories suivantes : stimulateurs de croissance, accroissement de l'efficacité de l'alimentation, lutte contre la maladie, prophylaxie ou thérapie. Cela pourrait accroître la pression sélective de la résistance, compromettant finalement l'efficacité dans l'une ou l'autre catégorie (SANTÉ CANADA – DIRECTION DES MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES, 2002).

L'administration d'antibiotiques par voie buccale, qui est la voie habituelle pour le traitement, la prophylaxie ou pour favoriser la croissance, conduit invariablement à la sélection de souches résistantes, particulièrement parmi les entérobactéries et d'autres bacilles à Gram-négatif, qui deviennent alors prédominants. Le travail le plus probant a été fait sur *E. coli*. Les plus hautes fréquences d'*E. coli* antibiorésistants s'observent chez les veaux (75%), les porcs (76%), et la volaille (77%) dans les cas où des antibiotiques ont été largement utilisés. Ces micro-organismes constituent évidemment une abondante source de plasmides R, qui sont potentiellement transférables à toute une gamme de bacilles à Gram-négatif, pathogènes pour l'Homme, susceptibles d'être présents dans l'intestin (OMS, 1983).

En résumé *E. coli* est une bactérie qui possède des caractéristiques communes aux Enterobacteriaceae. Certaines souches de colibacilles présentent un pouvoir pathogène après acquisition de gènes de pathogénicité. La détermination des sérotypes est le premier système qui a permis, dans une certaine mesure, de différencier les souches pathogènes des souches commensales. Par la suite des propriétés de virulence, directement ou indirectement reliées au pouvoir pathogène des *E. coli* ont été reconnues. Depuis quelques années, il est noté que les *E. coli* responsables de colibacilloses chez les volailles présentent des fréquences de résistance aux antibactériens très élevées avec une tendance nette à la multirésistance.

C'est justement dans le but de caractériser les E. coli isolés des cas de colibacilloses aviaires au Sénégal et d'évaluer leur sensibilité aux antibiotiques que nous avons entrepris cette étude. Elle fait l'objet de la deuxième partie de notre travail.

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : MATERIEL ET METHODES

I.1. Contexte de l'étude

Suite aux énormes pertes économiques imputées aux colibacilloses dans le secteur avicole au Sénégal, une étude a été menée en 2010 par **NDIAYE** afin d'approfondir les connaissances sur les colibacilloses aviaires au Sénégal. Il s'agissait de décrire les aspects cliniques et lésionnels de la colibacillose et de réaliser des analyses de laboratoire (Histologique et Bactériologique) afin de mieux affiner le diagnostic de cette maladie. C'est ainsi que des souches d'*E. coli* ont été isolées et identifiées sur la base de tests biochimiques.

Cependant, ces souches ne peuvent être systématiquement incriminées car *E. coli* est une espèce au sein de laquelle on retrouve à la fois des souches commensales, et des souches ayant acquis des facteurs de virulence et présentant des risques de contamination des denrées alimentaires d'origine animale. Les souches pathogènes des *E. coli* sont classées en sérotypes sur la base de leurs antigènes et en pathotypes sur la base de la possession de certains facteurs de virulence.

C'est dans ce contexte que cette étude a été menée et dont l'objectif général est de réaliser une caractérisation phénotypique et génétique.

I.2 Matériel

I.2.1 Matériel biologique

Il s'agissait de souches d'*E. coli* obtenues à partir de cultures pures conservées au congélateur à -20°C dans du glycérol. Ces souches auxquelles de nouvelles souches se sont ajoutées en 2011 ont été isolées des cas de colibacilloses aviaires en 2010 par **NDIAYE (2010)**. Les souches provenaient des fermes de poulets de chair et de ponte des zones de Dakar et Thiès (**Tableau II**)

Tableau II : Répartition des souches suivant leur origine

Zones	Spéculation		Total
	Chair	Ponte	
Dakar	29	3	32
Thiès	12	14	26
Total	41	17	58

I.2.2 Matériel de laboratoire

I.2.2.1 Matériel et milieu de repiquage et d'identification des *E. coli*

- Matériel lourd : incubateur, plaque chauffante à gaz, autoclave, balance de précision,
- Verrerie : béchers, éprouvettes graduées,
- Petit matériel : bec bunsen, anse à usage unique, boîtes de Pétris, entonnoir muni de potence, tubes de bactériologie à vis, Casserole,
- Milieu : milieu MacConkey,

I.2.2.2 Matériel et réactifs de l'antibiogramme

- Gélose au sang
- Standard pour Mac-Farland 0,5,
- Plaque de gélose de Mueller-Hinton (150 x 15mm),
- Tube en verre de 10 ml d'eau distillée stérile
- Disques d'antibiotiques et distributeur de disques d'antibiotiques
- Turbidimètre
- Coton-tige, pince, règle graduée
- Disques d'antibiotique : amikacine (AN), amoxicilline (AMC), ampicilline (AM), cefoxitine (FOX), ceftriaxone (CRO), chloramphenicol (C), ciprofloxacine (CIP), gentamicine (GM), kanamycine (K), acide nalidixique (NA), ceftiofur (XNL), triméthoprime-Sulfaméthoxazole (SXT), sulfisoxazole (G), streptomycine (S), tétracycline (TE).

I.2.2.3 Matériel et milieu d'extraction de l'ADN

- Matériel lourd : centrifugeuse, Anse
- Verrerie : tubes de 1,5 ml, pipette, verre corning
- Petit matériel : anse à usage unique, marqueur
- Milieux : Bouillon Luria Bertani (LB), bouillon de soja tryptique modifié (mTSB)

I.2.2.4 Matériel et réactifs de la PCR

- Hotte biologique
- Thermocycleur, microcentrifugeuse
- Tubes à PCR, pipettes

- Eau distillée, Chlorure de magnésium (Mgcl₂), dNTP
- Contrôles positifs
- Amorces : gènes de virulence (ExPEC (*iucD*, *tsh*, *papC*, *cnf*), STEC (*stx1*, *stx2*, *eae*)) et des sérotypes (O1, O2, O4, O6, O15, O18, O25, O75, O78)

I.2.2.5 Matériel et réactifs de l'électrophorèse

- Générateur
- Cuve à électrophorèse
- Pipettes
- Peignes, Erlenmeyer, solution tampon
- Gel d'agarose, SYBr
- Solution de 100 paires de bases
- Bleu de bromophénol
- Produits PCR

I.3 Méthodes

I.3.1 Repiquage des souches et identification

Les souches ont été repiquées dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose MacConkey (préparée selon les recommandations du fabricant). C'est un milieu sélectif pour les bactéries à Gram négatif en particulier *E. coli*. Les différentes boîtes de pétriensemencées ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures après lesquelles la lecture a été faite. Sur ce milieu les colonies apparaissent en couleur rose.

I.3.2 Antibiogramme

- Ensemencer l'isolat sur la gélose au sang (permet de sélectionner les souches hémolytiques). Incuber les plaques pendant 24 heures (une nuit) à 37 ° C ;
- Calibrer le turbidimètre avec le tube standard MacFarland 0,5 ;
- Prendre une petite quantité de bactéries avec un coton-tige et ensemencer un tube contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Homogénéiser pendant 5 secondes ;
- Insérer le tube dans le puits. Le résultat sera affiché : < 0,5, = 0,5 ou > 0,5. Ajuster pour obtenir 0,5 ;

- Tremper un coton-tige dans la suspension de l'isolat. Appuyer doucement la tige contre la paroi intérieure du tube pour enlever l'excès de liquide et ensemencer la boîte de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton ;
- Laisser les boîtes de pétri sécher pendant environ 5 minutes ;
- Ensuite, placer les disques d'antibiotique sur la surface de la gélose en utilisant le distributeur de disques ;
- En utilisant une pince stérile, appuyer doucement sur les disques en prenant soin de ne pas les enfoncer dans la gélose ;
- Retourner les boîtes de pétri et incuber 24h (une nuit) à 37°C ;
- En utilisant une règle, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition (si présent) pour chaque antibiotique utilisé ;
- Comparer le diamètre obtenu à partir de chaque disque d'antibiotiques à celui de la charte fournie par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Annexe 1) pour déterminer si l'espèce bactérienne testée est soit résistante ou de sensibilité intermédiaire ou sensible à l'antibiotique.

I.3.3 Caractérisation génétique des *E. coli*

I.3.3.1 Objectif

Les *E. coli* pathogènes chez les animaux et zoonotiques (APZEC) sont porteurs de gènes codant pour des facteurs de virulence pouvant causer des maladies chez les animaux ou chez l'Homme. Les APZEC sont divisés selon différents pathotypes : ETEC, EPEC, STEC/VTEC et ExPEC.

Les STEC/VTEC sont porteurs des gènes codant pour VT1/Stx1 et/ou VT2/Stx2. Les STEC/VTEC potentiellement pathogènes pour l'homme portent fréquemment le gène *eae*.

La plupart des ExPEC détiennent les gènes codant pour l'aérobactine, et en général ont les gènes codant pour l'hémolysine sensible à la température, la cytotoxine nécrosante ou le fimbriae P.

L'objectif de cette procédure est de détecter par PCR multiplexe les sérotypes et les gènes de virulence dans des cultures d'*E. coli* précédemment obtenues.

I.3.3.2 Principe

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis. C'est une technique d'amplification enzymatique qui permet à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) de copies identiques de ce même fragment.

Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTP, les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium ($MgCl_2$). Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme. Le processus met en jeu une série de cycles en trois étapes :

- La dénaturation : c'est l'étape dans laquelle l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice par rupture des liaisons d'hydrogène. L'ADN double-brin est donc dénaturé en ADN simple brin.
- L'hybridation : dans cette étape les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN.
- L'élongation : c'est étape dans laquelle la Taq polymérase (qui est une enzyme très spéciale, puisqu'elle est thermorésistante) permet de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTP libres présents dans le milieu réactionnel.

La durée et la température de chaque étape sont choisies en fonction de la composition de la séquence à amplifier. On répète ce cycle un certain nombre de fois (en moyenne 35), puis on révèle les fragments d'ADN amplifiés par électrophorèse : la migration se fait en fonction du poids moléculaire des fragments d'ADN amplifiés. La comparaison avec le poids moléculaire des séquences recherchées permet de savoir si elles sont amplifiées ou non.

I.3.3.3 Méthodologie

I.3.3.3.1 Préparation de l'échantillon

Les cultures présentes sur milieu solide (MacConkey) sont traitées selon les étapes suivantes:

- Prendre une strie dans le premier quadrant avec une anse (à usage unique) et ensemercer dans un tube de 5 ml de bouillon Lauria Bertani ou LB (destiné à la

recherche des gènes de virulence des ExPEC et des sérotypes) et 5 ml de bouillon de Soja triptique modifié ou mTSB (servant à la détection des gènes de virulence des STEC) dont le rôle est d'inhiber la croissance des bactéries autres que les STEC ;

- Incuber toute la nuit à 37°C.

I.3.3.3.2 Extraction de l'ADN

Cette méthode est adaptée de la méthode utilisée par le Laboratoire de lutte contre les zoonoses d'origine alimentaire en Ontario au Canada :

- Identifier l'échantillon par un code sur le dessus d'un tube de 1,5 ml, centrifuger 1 ml de la culture LB pour les ExPEC et 1ml de la culture mTSB pour les STEC (incubées toute la nuit à 37°C) à 12 000 tours/mn pendant 2 minutes ;
- Jeter le surnageant dans une bouteille en verre corning réservée à cet usage ;
- Ajouter 1 ml de FA buffer au culot, bien mélanger (Homogénéiser au vortex) ;
- Centrifuger à 12 000 tours/mn pendant 2 minutes, enlever le surnageant et suspendre le culot dans 0,5 ml d'eau distillée stérile et homogénéiser (au vortex) ;
- Chauffer à 100°C pendant 10 minutes, centrifuger à 12 000 tours/mn pendant 2 minutes. Transférer le surnageant contenant l'ADN dans un autre tube et identifier le tube. Conserver l'échantillon d'ADN à -20°C jusqu'à son utilisation.

Les extraits d'ADN ont été utilisés pour la recherche, par PCR, des gènes de virulence et des sérotypes O.

I.3.3.3.3 Réactions PCR pour la recherche des gènes de virulence et des sérotypes

1.3.3.3.3.1 Recherche des gènes de virulence

Le préalable à la réalisation de la réaction PCR est la préparation des masters mix ou milieux réactionnels. Un master mix est une solution mère destinée à la réalisation des réactions PCR. Les masters mix que nous avons préparés incluent des quantités appropriées des amorces de chaque gène, de dNTP, de Taq polymérase, de chlorure de magnésium (MgCl₂) et d'eau distillée stérile (**Tableau III**). La recherche des gènes de virulence des ExPEC (*iucD*, *tsh*, *papC* et *cnf*) et des STEC (*eae*, *stx1* et *stx2*) s'est faite par deux PCR multiplexes (une PCR multiplexe étant une réaction PCR au cours de laquelle, plusieurs gènes sont testés à la fois).

Tableau III : Composition et quantités nécessaires pour un master mix pour 30 réactions PCR

MASTER MIX ExPEC		MASTER MIX STEC	
Tampon 10X PCR avec Mgcl ₂	75µl		
Mélange de 2mM dNTP	75µl	Tampon 10X PCR avec Mgcl ₂	75µl
Solution de 10µM amorce* <i>papC</i> _{For}	37,5µl	Mélange de 2mM dNTP	75µl
Solution de 10µM amorce* <i>papC</i> _{Rev}	37,5µl	Solution de 10µM amorce* <i>eae</i> _{For}	37,5µl
Solution de 10µM amorce* <i>cnf</i> _{For}	37,5µl	Solution de 10µM amorce* <i>eae</i> _{Rev}	37,5µl
Solution de 10µM amorce* <i>cnf</i> _{Rev}	37,5µl	Solution de 10µM amorce* <i>sxt1</i> _{For}	37,5µl
Solution de 10µM amorce* <i>iucD</i> _{For}	37,5µl	Solution de 10µM amorce* <i>sxt1</i> _{Rev}	37,5µl
Solution de 10µM amorce* <i>iucD</i> _{Rev}	37,5µl	Solution de 10µM amorce* <i>sxt2</i> _{For}	37,5µl
Solution de 10µM amorce* <i>tsh</i> _{For}	37,5µl	Solution de 10µM amorce <i>sxt2</i> _{Rev}	37,5µl
Solution de 10µM amorce* <i>tsh</i> _{Rev}	37,5µl	H ₂ O distillée stérile, gardée à température pièce	219µl
H ₂ O distillée stérile, gardée à température pièce	144µl	2 U Taq DNA Polymérase (5U/ µl)	6µl
2 U Taq DNA Polymérase (5U/ µl)	6µl		
TOTAL	600µl	TOTAL	600µl

* : Séquences des amorces reportées dans le tableau IV

Source : EcL (2011)

Pour les PCR des gènes de virulence, nous avons utilisé des amorces de gènes ayant des séquences nucléotidiques spécifiques et des souches de contrôle positives. Le tableau IV présente les séquences des amorces de chaque gène, les souches de contrôle positives utilisées ainsi que la taille moléculaire de chaque gène testé.

Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour la détection par PCR multiplexe des gènes de virulence des ExPEC et des STEC

PATHOTYPES	FACTEUR DE VIRULENCE	GENE	SEQUENCE DE L'AMORCE	TAILLE DE L'AMPLICON (bp)	TD (°C)	SOUCHE CONTROLE
ExPEC	CNF (multiplex)	<i>cnf</i>	For 5' TTA TAT AGT CGT CAA GAT GGA	634	60	ECL 13421
	CNF (multiplex)	<i>cnf</i>	Rev 5' CAC TAA GCT TTA CAA TAT TGA C	634	60	ECL 13421
	P (PapC)	<i>papC</i>	For 5' GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGCG	328	60	ECL 13421
	P (PapC)	<i>papC</i>	Rev 5' ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AATA	328	60	ECL 13421
	Aérobactine	<i>iucD</i>	For 5' AAG TGT CGA TTT TAT TGG TGT A	778	60	ECL 17088
	Aérobactine	<i>iucD</i>	Rev 5' CCA TCC GAT GTC AGT TTT CTG	778	60	ECL 17088
	Tsh	<i>tsh</i>	For 5' GGT GGT GCA CTG GAG TGG	640	55	ECL 17088
	Tsh	<i>tsh</i>	Rev 5' AGT CCA GCG TGA TAG TGG	640	55	ECL 17088
STEC	Stx1	<i>stx1A</i>	For 5' TTA GAC TTC TCG ACT GCA AAG	531	60	ECL 6611
	Stx1	<i>stx1A</i>	Rev 5' TGT TGT ACG AAA TCC CCT CTG	531	60	ECL 6611
	Stx2	<i>stx2A</i>	For 5' TTA TAT CTG CGC CGG GTC TG	327	60	ECL 6611
	Stx2	<i>stx2A</i>	Rev 5' AGA CGA AGA TGG TCA AAA CG	327	60	ECL 6611
	EAE (Intimin)	<i>eae</i>	For 5' CAT TAT GGA ACG GCA GAG GT	791	60	ECL 6611
	EAE (Intimin)	<i>eae</i>	Rev 5' ATC TTC TGC GTA CTG CGT TCA	791	60	ECL 6611

T= thymine ; A= adénine ; C = cytosine ; G = guanine ; bp = paire de base ; TD = température de dénaturation, ECL = *E. Coli*

Source : Ecl (2011)

I.3.3.3.2 Recherche des sérotypes

Comme pour la recherche des gènes de virulence, la recherche des sérotypes a nécessité la préparation préalable de masters mix incluant des quantités appropriées d'amorces de chaque sérotypes, de dNTP, de MgCl₂, etc. Il faut noter que la recherche des sérotypes O s'est faite par deux types de réactions PCR :

- ✓ le premier type est constitué de deux PCR multiplexes (une pour la recherche du pool n°1 constitué des sérotypes de O1, O2, O6 et O18 et l'autre pour le pool n°2 incluant les sérotypes O4, O15, O25 et O75) ;
- ✓ le deuxième type est une PCR uniplexe (une PCR uniplexe est une PCR qui ne teste qu'un seul sérotype) destinée à la recherche du sérotype O78.

Les masters mix préparés pour les pools 1 et 2 ainsi que du sérotype O78 sont consignés dans le **Tableau V**.

Tableau V : **Composition et quantités nécessaires pour un master mix pour 40 réactions PCR**

MASTER MIX POOL 1		MASTER MIX POOL 2		MASTER MIX O78	
Front	50µl	Front	50µl		
O1*	50µl	O4*	50µl		
O2*	50µl	O15*	50µl		
O6*	50µl	O25*	50µl	O78*_{For}	50µl
O18*	50µl	O75*	50µl	O78*_{Rev}	50µl
dNTP	100µl	dNTP	100µl	dNTP	100µl
Tampon 10X PCR avec Mgcl₂	100µl	Tampon 10X PCR avec Mgcl₂	100µl	2 U Taq DNA Polymérase (5U/µl)	100µl
2 U Taq DNA Polymérase (5U/ µl)	8µl	2 U Taq DNA Polymérase (5U/ µl)	8µl	H2O	8µl
H2O	342µl	H2O	342µl		
TOTAL	800µl	TOTAL	800µl	TOTAL	800µl

* : Séquences des amorces reportées dans le tableau VI

Source : EcL (2011)

Les amorces utilisées ont des séquences nucléotidiques spécifiques et nous avons utilisé pour chaque sérotype, des souches de contrôle positives (**Tableau VI**).

Tableau VI : Séquences des amorces utilisées pour la détection par PCR mutiplexe des sérotypes O

SEROTYPES	AMORCES	PAIRE DE BASE	SOUCHE CONTROLE
O1	5'-CCAGAAATACACTTGGAGAC-3'	189	ECL O1
O2	5'-GTGACTATTTTCGTTACAAGC-3'	274	ECL O2
O4	5'-AGGGGCCATTTGACCCACTC-3'	193	ECL O4
O6	5'-AAATGAGCGCCCACCATTAC-3'	584	ECL O6
O15	5'-TGATAATGACCAACTCGACG-3'	536	ECL O8
O18	5'- GAAGATGGCTATAATGGTTG -3'	360	ECL O18
O25	5'-GAGATCCAAAAACAGTTTGTG -3'	313	ECL O25
O75	5'-GTAATAATGCTTGCGAAACC -3'	419	ECL O75
O78_{For}	For 5'-TGGTAGCTGTAAGCCAAGGGCG 3'	801	ECL O78
O78_{Rev}	Rev 3'-TCCCCTCCACCTTTGGCGCAAT-5'		

Sources : Pour pool 1 et pool 2 : Clermont et al. (2007) ; pour O78 : EcL (2011)

Il convient de signaler que la recherche des gènes de virulence ainsi que du sérotype O78 se fait au moyen des PCR par amplification exponentielle alors que la recherche des sérotypes des pools 1 et 2 se fait par amplification linéaire. C'est pour cette raison que les séquences des amorces des gènes de virulence et du sérotype O78 sont constituées de deux brins alors que celles des sérotypes des pools 1 et 2 ne sont constituées que d'un seul brin.

I.3.3.3.4 Réalisation de la PCR

La réalisation de la réaction PCR se fait selon le même protocole aussi bien pour la recherche des gènes de virulence que pour celle des sérotypes O. Les masters mix ci-dessus préparés ont servi à la préparation des tubes PCR qui reçoivent chacun 20 µl de master mix préalablement homogénéisés. A ces 20 µl de master mix, sont ajoutés 5 µl d'extrait d'ADN à tester également homogénéisés au préalable à l'aide d'un vortex. Le mélange est à son tour homogénéisé pendant quelques secondes à l'aide d'une micro-centrifugeuse puis chaque tube PCR est disposé dans le bloc chauffant du thermocycleur et on lance la réaction PCR suivant un cycle de températures approprié.

Les cycles de températures utilisés pour la détection des gènes de virulence sont présentés dans le **Tableaux VII**.

Tableau VII: Cycles de température pour la détection des gènes de virulence des *E. coli* d'origine aviaire

ETAPES	CYCLE DE TEMPERATURE ExPEC	CYCLE DE TEMPERATURE STEC
1	94°C pour 5 minutes	94°C pour 5 minutes
2	94°C pour 30 secondes	94°C pour 30 secondes
3	55°C pour 30 secondes	60°C pour 30 secondes
4	72°C pour 30 secondes	72°C pour 30 secondes
5	Répéter de 2 à 4 pour 24 autres cycles	Répéter de 2 à 4 pour 24 autres cycles
6	72°C pour 5minutes	72°C pour 5minutes
7	4°C jusqu'à la fin	4°C jusqu'à la fin

Source : ECL (2011)

Le Tableau VIII présente les cycles de températures utilisés pour la recherche des sérotypes des pools 1 et 2 (mêmes cycles) et du sérotype O78.

Tableau VIII: Cycles de température pour le sérotypage des *E. coli* d'origine aviaire

ETAPES	CYCLE DE TEMPERATURE POOL 1 et POOL 2	CYCLE DE TEMPERATURE O78
1	94°C pour 4 minutes	95°C pour 2 minutes
2	94°C pour 5 secondes	94°C pour 30 secondes
3	59°C pour 10 secondes	Répéter de 1 à 2 pour 25 autres cycles
4	Répéter de 2 à 4 pour 29 autres cycles	60°C pour 30 secondes
5	72°C pour 5 minutes	72°C pour 30 secondes
6	4°C jusqu'à la fin	4°C jusqu'à la fin

Source : EcL (2011)

I.3.3.3.5 Électrophorèse sur gel d'agarose

I.3.3.3.5.1 Préparation du gel

- Prendre 2,3g de poudre d'agarose et dissoudre dans un Erlen contenant 30 ml de solution tampon puis chauffer le mélange dans un four à micro-onde pendant 60 secondes ;
- Remuer le mélange et réchauffer de nouveau pendant 45 secondes.
- Ensuite ajouter 3 µl de SYBr (fluorophore permettant de visualiser le gène présent dans l'échantillon) puis verser le mélange dans le moule une fois les peignes placés (permet l'obtention de puits)
- Laisser reposer 1 heure dans l'obscurité (pour éviter la dénaturation du SYBr).

I.3.3.3.5.2 Réalisation de l'électrophorèse

- Mettre dans chaque puits 15 µl de produit de la PCR préalablement coloré avec du bleu de bromophénol, sauf le premier puits qui lui reçoit 5µl de la solution colorée de paires de bases et le (s) dernier (s) qui reçoit(reçoivent) le (s) contrôle (s) positif (s) ;
- Lancer l'électrophorèse sous un voltage constant de 98 volts pendant 30 – 40 mn correspondant au temps de migration ;

- Utiliser le logiciel Fusion-X pour l'acquisition d'une image de l'électrophorèse dont la lecture se fait suivant la présence d'une bande correspondant au poids moléculaire du gène testé. Un échantillon est positif à un gène lorsqu'une bande fluorescente blanche apparaît sur sa zone de migration et lorsque cette bande se situe sur la même ligne horizontale que celle de la bande du contrôle positif (celle-ci est repérée grâce aux paires de bases).

I.2.4 Analyses statistiques

Les données ont été saisies sur une feuille *Excel de Microsoft 2007*. Elles ont été analysées en utilisant le logiciel *SPSS*[®] [version *Pro.10*]. Le test d'ANOVA a été utilisé pour comparer les fréquences des réponses en fixant le seuil de significativité à 5%.

Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Résultats

II.1.1 Prévalence des résistances aux antibiotiques

Cinquante huit (58) isolats d'*E. coli* ont fait l'objet d'un test de sensibilité à quinze (15) antibiotiques. Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés pour la tétracycline (95%), le sulfisoxazole (90%), l'ampicilline (78%) et la streptomycine (71%). Nous notons par ailleurs une résistance de 22% pour le chloramphénicol.

En revanche, les antibiotiques tels que la kanamycine, la gentamicine et le ceftiofur ont montré des niveaux de résistance les plus bas avec respectivement 7%, 5% et 3%. Toutefois aucune résistance n'a été observée pour quatre antibiotiques à savoir l'amoxicilline, le ceftriaxone, l'amikacine et la cefoxitine. Par ailleurs, l'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les différentes prévalences. Le **tableau XIII** présente les résultats détaillés.

Parmi les isolats testés 51 (88%) étaient résistants à au moins quatre (4) antibiotiques et un (1) isolat présentait une résistance à neuf (9) antibiotiques.

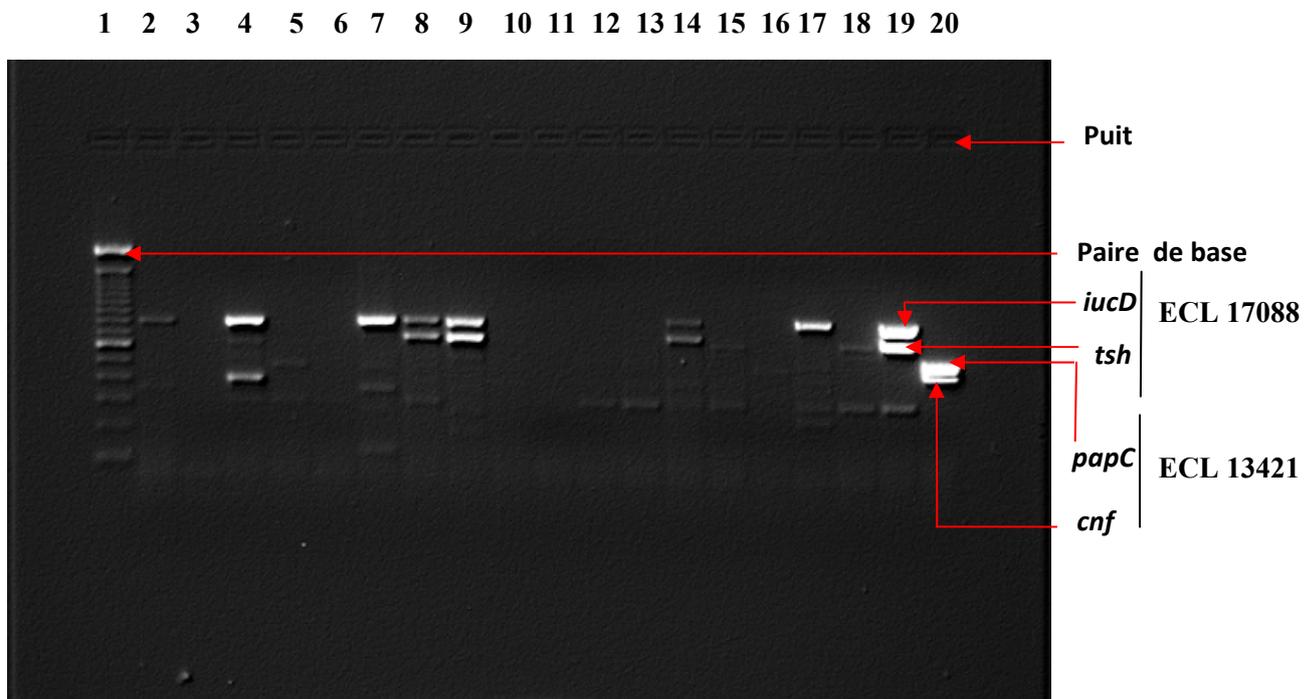
Tableau IX : Prévalence des résistances aux antibiotiques des souches d'*E. coli* aviaires testées

ANTIBIOTIQUES	SENSIBILITE	NOMBRE	PREVALENCE (%)
Tétracycline (TE)	Résistant	55	95
	Intermédiaire	01	02
	Sensible	02	03
Sulfisoxazole (G)	Résistant	52	90
	Intermédiaire	00	0
	Sensible	06	10
Ampicilline (AM)	Résistant	45	78
	Intermédiaire	02	03
	Sensible	11	19
Streptomycine (S)	Résistant	41	71
	Intermédiaire	06	10
	Sensible	11	19
Trimethoprime-Sulphaméthaoxazole (SXT)	Résistant	38	65
	Intermédiaire	01	02
	Sensible	19	33
Acide nalidixique (NA)	Résistant	28	48
	Intermédiaire	03	05
	Sensible	27	46
Chloramphenicol (C)	Résistant	13	22
	Intermédiaire	00	0
	Sensible	45	78
Ciprofloxacine (CIP)	Résistant	8	14
	Intermédiaire	00	0
	Sensible	50	86
Kanamycine (K)	Résistant	4	07
	Intermédiaire	00	0
	Sensible	54	93
Gentamicine (GM)	Résistant	03	05
	Intermédiaire	00	00
	Sensible	55	95
Ceftiofure (XNL)	Résistant	02	03
	Intermédiaire	02	03
	Sensible	54	94
Amoxicilline (AMC)	Résistant	00	0
	Intermédiaire	04	07
	Sensible	54	93
Ceftriaxone (CRO)	Résistant	00	0
	Intermédiaire	03	05
	Sensible	55	95
Amikacine (AN)	Résistant	00	0
	Intermédiaire	00	0
	Sensible	58	100
Cefoxitine (FOX)	Résistant	00	0
	Intermédiaire	00	0
	Sensible	58	100

II.1.2 Présentation des résultats des PCR

Un échantillon est positif à un gène lorsqu'une bande fluorescente apparaît sur sa zone de migration et lorsque cette bande se situe sur la même ligne horizontale que celle de la bande du gène du contrôle positif (celle-ci est repérée grâce aux paires de bases).

La figure 8 représente une image d'électrophorèse du produit PCR réalisé pour les gènes de virulence des ExPEC.



ECL 17088 et ECL13421 : contrôles positifs (puits 19 et 20) ; puits 2, 4, 7,8, 9, 14,17 : échantillons positifs au gène *iucD* ; puits 4, 8, 9, 14,18 : échantillons positifs au gène *tsh* ; puits 4 : échantillons positifs au gène *papC* ; puits 7 : échantillon positif au gène *cnf*.

Figure 8 : Image d'une électrophorèse pour les gènes de virulence des ExPEC

II 1.2.1 Prévalence des gènes de virulence

Au total, 58 échantillons ont été testés par deux (2) PCR multiplexes, l'une pour la présence de quatre (4) gènes de virulence des ExPEC (*iucD*, *tsh*, *papC* et *cnf*) et l'autre pour la détection de trois (3) gènes de virulence des STEC (*eae*, *stx1* et *stx2*). Les résultats obtenus montrent une prévalence significativement élevée ($p < 0,05$) des gènes de virulence des ExPEC (*iucD* : 53%, *tsh* : 29%, *pap* : 10%, *cnf* : 10%) par rapport à la prévalence des gènes de virulence des STEC (*eae* : 2%, *stx1* : 2%, *stx2* : 0%). L'ensemble de ces résultats est consigné dans le **tableau X**.

Tableau X : Prévalence des gènes de virulence des souches d'*E. coli* aviaires testées

PATHOTYPES	GENES DE VIRULENCE	NOMBRE	PREVALENCE (%)
ExPEC	<i>iucD</i>	31	53
	<i>Tsh</i>	17	29
	<i>papC</i>	5	08
	<i>Cnf</i>	6	10
STEC	<i>Eae</i>	1	02
	<i>stx1</i>	1	02
	<i>stx2</i>	0	0%

II.1.2.2 Prévalence des virotypes

Sur les 58 isolats testés, 40% étaient non virotypables (négatifs pour les gènes recherchés) et 60% possédaient au moins un gène de virulence. Pour l'ensemble des isolats examinés, 15 (26%) avaient le virotype *iucD-tsh*, 10 (17%) avaient le virotype *iucD* et 3 (5%) avaient le virotype *cnf*. Le **tableau XI** présente l'ensemble des résultats obtenus pour le virotypage.

Tableau XI : Prévalence des virotypes des souches d'*E. coli* aviaires testées

VIROTYPES	NOMBRE	PREVALENCE (%)
<i>iucD</i>	10	17
<i>cnf</i>	3	05
<i>iucD-tsh</i>	15	26
<i>iucD-papC</i>	2	03
<i>iucD-cnf</i>	1	02
<i>papC-cnf</i>	1	02

<i>iucD-tsh-cnf</i>	2	03
<i>iucD-papC-eae-stx1</i>	1	02
Non virotypable	23	40
TOTAL	58	100

II.1.2.3 Prévalence des sérotypes

Neuf (9) sérotypes O ont été recherchés dans les 58 échantillons. Seulement 12 (21%) échantillons étaient sérotypables contre 46 (79%) non sérotypables (négatifs pour les sérotypes recherchés). Parmi les sérotypes obtenus, O25 était le plus prévalent (12%) suivi des sérotypes O4 (3%), O2 (2%), O15 (2%) et O78 (2%). Aucun isolat n'était positif aux sérotypes O1, O6, O18 et O75 (**Tableau XII**).

Tableau XII : Prévalence des sérotypes des souches d'*E. coli* aviaires testées

SEROTYPE	NOMBRE	PREVALENCE (%)
O1	0	0
O2	1	2
O4	2	3
O6	0	0
O15	1	2
O18	0	0
O25	7	12
O75	0	0
O78	1	2
Non sérotypables	46	79
TOTAL	58	100

II.1.1.4 Prévalence des séro-virotypes

Parmi les 12 échantillons sérotypables seulement 10 étaient associés à des gènes de virulence le séro-virotipe O25-*iucD-tsh* (10%) était le plus prévalent suivi des séro-virotypes O2-*iucD-tsh-cnf*, O15-*iucD*, O4-*iucD-tsh*, O78-*iucD-pap* avec une prévalence de 2% chacun (**Tableau XIII**).

Tableau XIII : Prévalence des séro-virotypes des souches d'*E. coli* aviaires testées

SERO-VIROTYPAGE	NOMBRE	PREVALENCE (%)
O15-<i>iucD</i>	1	2

O4-<i>iucD-tsh</i>	1	2
O25-<i>iucD-tsh</i>	6	10
O78-<i>iucD-pap</i>	1	2
O2-<i>iucD-tsh-cnf</i>	1	2

II.2 Discussion

II.2.1 Méthodologie

I.2.1.1 Choix des antibiotiques testés

La plupart des agents antimicrobiens sont classés dans les listes de l'OIE et de l'OMS. Cependant, l'examen des antimicrobiens d'importance critique montre que certaines classes figurent sur la liste de l'OMS tandis que d'autres ne figurent que sur la liste de l'OIE. Certaines classes se chevauchent, notamment lorsque la classe des antimicrobiens est considérée comme d'importance critique pour la santé humaine par l'OMS et d'importance critique pour la santé animale par l'OIE (FAO *al.*, 2007).

C'est ainsi qu'en 2007, la réunion mixte d'experts FAO/OMS/OIE sur les agents antimicrobiens d'importance critique a présenté deux (2) listes d'antimicrobiens d'importance critique publiées par l'OIE et l'OMS dans lesquelles figurent les quinze (15) antibiotiques testés dans nos travaux.

Le choix de ces antibiotiques a été fait dans le souci non seulement d'évaluer leur efficacité dans les colibacillooses aviaires au Sénégal mais aussi d'évaluer les conséquences des résistances pour la santé humaine.

II.2.1.2 Choix des gènes et des sérotypes testés

La caractérisation des ExPEC a consisté à rechercher quatre (4) gènes de virulence, en l'occurrence, les gènes *iucD*, *tsh*, *papC* et *cnf*. Ces gènes ont été choisis en raison de leur importance car il s'agit des gènes les plus incriminés dans les colibacillooses aviaires.

Les STEC sont des souches d'*E. coli* inoffensives pour les volailles mais leur pathogénicité est avérée pour les autres espèces animales dont l'Homme. La recherche de leurs gènes de virulence (*eae*, *stx1* et *stx2*) a été entreprise dans cette étude afin d'évaluer le risque de survenue de zoonose. En effet, les STEC peuvent coloniser le tractus digestif des volailles

(AFSSA, 2003) ; ce qui peut représenter un danger pour les aviculteurs et les consommateurs de poulets.

Les sérotypes O1, O2 et O78 ont été choisis parce qu'ils sont les sérotypes majeurs en aviculture (DHO-MOULIN et FAIRBROTHER, 1999). Les sérotypes O4, O6, O15, O18, O25 et O75 sont quant à eux les sérotypes rencontrés lors des infections urinaires chez l'homme et chez les autres espèces animales mais aussi dans les méningites néonatales ou encore dans la "diarrhée des voyageurs" ou "turista" (NAGY et FEKETE, 2005). Leur choix dans la présente étude est motivé par le souci d'évaluer les risques zoonotiques. Il faut aussi noter que la détection des sérotypes par PCR est une technique très récente par rapport à l'agglutination ce qui fait que l'on ne dispose pas de tous les contrôles positifs et amorces correspondant à tous les principaux sérotypes retrouvés chez les *E. coli*.

II.2.2 Résultats

II.2.2.1 Résultats de l'antibiogramme

L'analyse des résultats obtenus pour l'antibiogramme nous permet de dégager trois (3) grands groupes d'antibiotiques que sont :

- Les antibiotiques pour lesquels on note un faible niveau de résistance constitués par la **kanamycine** (7%), la **gentamicine** (5%), le **ceftiofur** (3%), l'**amoxicilline** (0%), le **ceftriaxone** (0%), l'**amikacine** (0%) et la **cefoxitine** (0%) qui sont des antibiotiques peu utilisés en aviculture au Sénégal ;
- Les antibiotiques pour lesquels on note un niveau de résistance intermédiaire constitués par le **chloramphénicol** (22%) et la **ciprofloxacine** (14%) ;
- Les antibiotiques pour lesquels on note un haut niveau de résistance constitués par la **tétracycline** (95%), le **sulfisoxazole** (90%), l'**ampicilline** (78%), la **streptomycine** (71%), l'association **triméthoprim sulfaméthoxazole** (65%) et l'**acide nalidixique** (48%). Ces antibiotiques sont les plus utilisés en aviculture au Sénégal.

Ces fréquences sont plus élevées que celles rapportées par HASSAN *et al.* (2011) dont les travaux ont porté sur 101 isolats d'*E. coli* pathogènes testés par la méthode de diffusion en gélose. Les résistances les plus fréquemment observées étaient contre la tétracycline (45,5%),

l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (26,7%), l'acide nalidixique (25,7%), l'ampicilline (25,7%) et la streptomycine (20,8%). Des résistances ont également été observées contre certains antibiotiques comme la ciprofloxacine (12,9%) et la gentamicine (2%).

Toutefois, nos résultats confirment les travaux de **CHASLUS-DANCLA et al. (1979)** qui ont montré que la résistance à la tétracycline est la plus fréquemment rencontrée avec 70% voire même 100% des *E. coli* totaux de la flore intestinale et 77% pour la streptomycine.

Ces résistances pourraient s'expliquer par l'utilisation abusive et anarchique des ces antibiotiques mais aussi le non respect des posologies au cours des traitements (**NDIAYE, 2010**). Elles témoignent également de l'utilisation de longue durée de ces antibiotiques, car l'utilisation abusive et prolongée conduit à réduire globalement leur efficacité dans le temps du fait de la capacité d'adaptation des bactéries.

Plus inquiétante est la multirésistance des souches d'*E. coli* testées. En effet, elle apparaît réellement comme un véritable problème car pour les quinze (15) antibiotiques testés lors de nos travaux 88% étaient résistants à au moins quatre (4) antibiotiques et un isolat présentait une résistance à neuf (9) antibiotiques. Ces fréquences sont plus élevées que celles rapportées par **HASSAN et al. (2011)**. En effet sur les 101 isolats d'*E. coli* pathogènes, ces auteurs ont trouvé plus de 55% d'isolats résistants à au moins un des composés testés, et 36,6% présentant de multiples résistantes aux médicaments.

D'autres motifs peuvent également être évoqués pour expliquer ces résistances comme par exemple, l'utilisation de ces antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation à titre prophylactique pour prévenir et maîtriser les infections, comme stimulateur croissance ou pour favoriser l'efficacité de la production (**SANTE CANADA – DIRECTION DES MEDICAMENTS VETERINAIRES, 2002**). En effet, il est bien établi que l'administration d'antibiotiques aux animaux, à quelque fin que ce soit, conduit à l'accumulation de bactéries résistantes dans leur flore (**OMS, 1983**).

Le risque lié à ces résistances est donc la sélection de bactéries pathogènes et résistantes à des antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine, car la plupart des familles d'antibiotiques utilisés en médecine humaine sont utilisés en médecine vétérinaire (**FAO et al., 2007**).

Il est aussi important de noter qu'au Sénégal, il existe une grande variété d'antibiotiques dont l'importation n'est pas systématiquement maîtrisée. Autrement dit, ces résistances pourraient

s'expliquer par une utilisation d'antibiotiques non contrôlés, de mauvaise qualité ou même interdit comme le chloramphénicol.

Les études de **WANG et al., (2010)** et de **JIANG et al., (2011)**, en Chine, sur des cas cliniques aviaires présentaient respectivement pour le chloramphénicol une fréquence de 74% (sur des souches d'*E. coli* isolées entre 2005 et 2008) et de 50, 2 %. Ces fréquences sont beaucoup plus élevées que celle obtenue dans nos travaux qui est de 22%. En médecine vétérinaire, son large spectre d'activité, son efficacité particulière et son coût modéré faisait du chloramphénicol un antibiotique très utilisé, mais le risque d'induction d'aplasie médullaire qu'il présente a conduit à son interdiction chez les animaux de production. Ainsi cette résistance pourrait être témoin de son utilisation par les aviculteurs au Sénégal.

Malgré l'utilisation récente des quinolones en aviculture des résistances apparaissent déjà car nous notons une prévalence de 14% pour la ciprofloxacine contre 48% pour l'acide nalidixique. Cette différence entre ces deux molécules s'expliquerait par l'ancienneté de l'usage de l'acide nalidixique par rapport à la ciprofloxacine.

WANG et al. (2010) ont rapporté des proportions de résistance de 87% pour la ciprofloxacine et 84% pour l'enrofloxacine ; tandis que **NDIAYE (2010)** avait obtenu, dans ses travaux, une fréquence de 31,48 % pour la fluméquine et 37, 04% pour la norfloxacine.

Ces résistances aux quinolones pourraient s'expliquer par leur utilisation abusive sur le terrain, car 60% des cliniciens les utilisent sur le terrain (**NDIAYE, 2010**).

Concernant la gentamicine (5%) et le ceftiofur (3%), nos résultats sont comparables à ceux rapportés par **GAY et al. (2008)** avec une résistance de 6% pour le ceftiofur et 2 à 5% pour la gentamicine. Cette faible résistance pourrait s'expliquer par leur coût assez élevé limitant ainsi leur utilisation fréquente sur le terrain. Il en est de même pour l'amikacine, le ceftriaxone et la cefoxitine pour lesquels nous ne notons aucune résistance.

II.2.2.2 Résultats de la PCR

Les gènes les plus prévalents sont *iucD* (53%) et *tsh* (29%). Même si ces fréquences sont relativement faibles, elles suivent le même ordre que celles rapportées par **JANBEN et al. (2001)** qui avaient trouvé, sur 150 échantillons d'*E. coli* isolés de cas de colibacillose aviaires. En Allemagne une prévalence de 88,7% pour le gène *iucD* et 85,3% pour le gène *tsh*. Le même constat est fait par **OH et al. (2011)** dans la péninsule coréenne qui rapportent des

prévalences de 100% pour le gène *iucD* et 82, 3% pour *tsh* sur 17 isolats obtenus sur des cas de colibacilloses aviaires.

Nos observations suggèrent que les gènes *iucD* et *tsh* sont probablement les plus largement distribués chez les *E. coli* isolées des prélèvements issus des cas cliniques au Sénégal.

La comparaison de nos résultats avec ceux de **NGELEKA et al. (2002)**, dans les Caraïbes, nous donne la même information selon laquelle le virotype *iucD-tsh* est le plus retrouvé avec cependant une prévalence beaucoup plus faible dans nos travaux (26% contre 53,8%). Cette différence pourrait s'expliquer par le nombre de souches utilisées dans nos travaux qui est de 58 contre 140 pour ceux de **NGELEKA et al. (2002)**.

Le virotype *iucD* présente une fréquence de 17% ; ce qui fait de lui le deuxième virotype le plus rencontré dans nos isolats.

Cette large diffusion des gènes *tsh* et *iucD*, ou des virotypes *iucD-tsh* et *iucD* pourrait s'expliquer par le fait qu'ils sont en association avec des fonctions étroitement liées à la pathogénicité complète et à la survie des isolats au sein de l'hôte. Parmi ces fonctions nous pouvons citer la capacité de survie en présence de faible concentration de fer et par la même occasion la multiplication dans le sang ou les organes internes pour *iucD* (**HUCHE, 2006**) et la stimulation de la réponse inflammatoire avec le dépôt de fibrines et le développement des lésions à hauteur des sacs aériens pour *tsh* (**MANIL et VAN-BOST, 2004**).

Le gène *cnf* dont l'effet est de favoriser le franchissement de la barrière épithéliale par les colibacilles a été retrouvé dans 10% des cas ce qui prouve que ce gène n'est pas largement diffusé chez les *E. coli* pathogènes aviaires au Sénégal.

Il en est de même pour le gène *papC* intervenant dans le mécanisme d'adhésion aux cellules épithéliales dans les voies urinaires qui a présenté une proportion de 8% alors que **OH et al. (2011)** ont obtenu une prévalence de 30% avec un échantillon beaucoup plus faible que le notre (58 contre 17).

Concernant les STEC, un (1) isolat présentant les gènes *eae* et *stxI* a été détecté ce qui confirme la capacité des STEC à coloniser le caecum et à persister chez le poulet (**AFSSA, 2003**).

Il existe très peu de travaux permettant de préciser la présence des STEC dans les élevages de volailles. Néanmoins dans une étude américaine, **DOYLE et SCHOENI (1987)** ont mis en

évidence dans une proportion de 4% le sérotype O157: H7 des STEC chez des *E. coli* provenant des carcasses de poulet. Ces différences de pourcentage avec nos résultats pourraient s'expliquer par la taille de leurs échantillons (n=263) plus élevée que la notre.

La détection de ces gènes aussi faible qu'elle soit ne doit pas être négligée car elle traduit une possible transmission des souches STEC à la volaille par les autres espèces telles que les ruminants et surtout les pigeons dont la présence est quasi constante dans les fermes avicoles au Sénégal.

Il faut noter que le gène *eae* est aussi retrouvé chez les EPEC ; ce amène à se poser la question sur la vraie nature de la souche portant ce gène.

Un total de 23 isolats (40%) étaient non virotypables ; ce qui indique qu'il est assez difficile de définir les caractéristiques des APEC, car certaines souches n'ont pas de facteurs de virulence ou des gènes de virulence. Il se pourrait que l'environnement de la ferme et la co-infection avec d'autres microorganismes influencent considérablement l'incidence des colibacilloses. Ceci pourrait également être dû au fait que certains gènes de virulences comme le gène *hly* codant pour l'hémolysine n'a pas été recherché dans les travaux car la culture des isolats sur la gélose au sang avant l'antibiogramme avait révélé que ces isolats étaient hémolytiques.

S'agissant du sérotypage, nos résultats ont montré que le sérotype O25 (12%) est le plus prévalent dans les fermes avicoles. Les sérotypes O2, O15 et O78 viennent en troisième position avec une prévalence de 2% chacun alors que les sérotypes O1, O6 et O75 n'ont été décelés dans aucun isolat.

Ces résultats s'opposent aux données collectées par le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture (France)) et qui nous ont été rapportées par **SOUILLARD et al. (2006)**. Ces auteurs rapportent, en effet, qu'après examen de 2427 souches de colibacilles, 40,7 % des souches étaient non sérotypables, 37,2 % étaient de type O78K80, 19,6 % de type O2K1 et 2,5 % de type O1K1.

Une proportion très élevée (79%) de nos souches était non sérotypable. Cette fréquence largement supérieure à celle de **NGELEKA et al. (2002)** (25%) et des données du RNOEA (40, 7%) pourrait être imputée au nombre limité de sérotypes ayant fait l'objet de recherche dans nos travaux.

Nos résultats diffèrent également de ceux obtenus par **YAGUCHI et al. (2007)** qui, par des tests d'agglutination, avaient trouvé les sérotypes O1, O2 et O78 dans une proportion globale de 44,8% parmi 125 souches d'*E. coli* isolées de poulets malades au Japon.

Il ressort donc de cette analyse que le sérotype O25 est le sérotype le plus largement diffusé parmi les *E. coli* pathogènes aviaires au Sénégal. La présence majoritaire des sérotypes O25 et O4 dans nos isolats pourrait provenir des autres espèces car il s'agit des sérotypes responsables des méningites néonatales, des infections urinaires et des syndromes diarrhéiques chez les autres espèces dont l'Homme.

Les résultats obtenus pour les séro-virotypes présentent le séro-virotipe O25-*iucD-tsh* (10%) comme étant le plus représenté suivi des séro-virotypes O2-*iucD-tsh-cnf*, O15-*iucD*, O4-*iucD-tsh* , O78-*iucD-pap* avec une prévalence de 2% chacun. Cette tendance est quelque peu différente de celle indiquée dans les travaux de **NGELEKA et al. (2002)** ; car ces derniers rapportent que l'association sérotype- virotipe fait intervenir les virotypes *iuc-tsh* et *iuc-tsh-pap*, la différence se situant au niveau du sérotype. En effet, dans leurs travaux, les séro-virotypes étaient surtout formés avec les sérotype O2 et O78 ; alors que dans notre étude, on retrouve surtout le sérotype O25. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le sérotype O25 est le sérotype le plus largement diffusé dans les *E. coli* pathogènes dans nos travaux.

RECOMMANDATIONS

❖ A l'endroit des pouvoirs publics :

- Le renforcement de l'hygiène des denrées alimentaires par :
 - le contrôle des carcasses de poulets vendues sur le marché ;
 - le dénombrement des *E. coli* et la recherche de certains pathotypes responsables de zoonoses ;
- Le contrôle de l'utilisation des antibiotiques par :
 - la réglementation de l'usage des antibiotiques susceptibles d'être résistants chez l'Homme ;
 - l'éducation et la sensibilisation des éleveurs sur les dangers que représentent les résidus d'antibiotiques ;
- La surveillance de la résistance aux antibiotiques en renforçant la collaboration entre professionnels de la santé vétérinaire et humaine avec comme objectif la mise en place d'une surveillance des *E. coli* zoonotiques ;

❖ A l'endroit des éleveurs :

- Encourager le respect des normes de biosécurité lors de l'installation des fermes avicoles et des activités de production avec de bonnes pratiques d'élevage
- Sensibiliser les éleveurs sur l'automédication

❖ A l'endroit des vétérinaires :

- Appliquer une plus grande rigueur dans la prescription des médicaments et l'instauration d'un traitement après la réalisation d'un antibiogramme ;
- Promouvoir un suivi sanitaire régulier des fermes avicoles et une collaboration étroite avec les aviculteurs

❖ Aux chercheurs :

- D'associer le diagnostic clinique de la colibacillose avec un diagnostic de laboratoire avec recours fréquent à la PCR

- De faire la caractérisation phylogénétique des *E. coli* afin de connaître les groupes phylogéniques des *E. coli* au Sénégal
- D'envisager une caractérisation génétique en vue de connaître les gènes contrôlant la résistance des *E. coli* aux antibiotiques les plus utilisés dans les élevages avicoles au Sénégal
- De mener des investigations sur les autres sérotypes (O157, O111 etc.)
- De mener des investigations sur les *E. coli* des autres espèces animales présentes dans les fermes avicoles afin d'élucider le rôle épidémiologique que jouent ces espèces animales dans la contamination des volailles et de l'Homme. On pourrait également envisager la recherche des autres pathotypes d'*E. coli* tels que les EPEC, les UPEC etc. pour voir si les volailles peuvent aussi constituer des hôtes réservoirs

CONCLUSION GENERALE

Le 24 novembre 2005, le Sénégal avait adopté une mesure d'interdiction de toutes importations de viandes et des produits de volailles afin d'éviter l'introduction de la grippe aviaire. Cette mesure a permis la relance de l'aviculture moderne afin de satisfaire la demande toujours croissante en protéines animales. Malheureusement, cette aviculture se trouve confrontée à diverses contraintes dont celles pathologiques parmi lesquelles on note une recrudescence de la colibacillose associée à une forte résistance aux antibiotiques.

Maladie bactérienne due à *E. coli*, la colibacillose provoque de nombreuses pertes économiques suite aux mortalités embryonnaires et du jeune poussin, aux septicémies, aux affections respiratoires chroniques associées et d'autres affections diverses telles que des salpingites, des ovarites, des aérosaculites, des péricardites et des périhépatites sévères. En l'absence d'un vaccin pour lutter efficacement contre la colibacillose, seule l'antibiothérapie suite à un diagnostic précis accompagné d'un antibiogramme et la prophylaxie sanitaire restent encore les moyens de lutte contre cette maladie.

Les *E. coli* du groupe APEC, responsables des colibacilloses aviaires, possèdent un certain nombre de facteurs de virulence parmi lesquels on peut citer l'aérobactine, les toxines et les adhésines. C'est donc dans le but de déterminer les principaux profils de virulence ainsi que les sérotypes qui leurs sont associés que cette étude a été menée.

Certains *E. coli* comme les STEC dont la volaille est un des réservoirs peuvent infecter l'homme d'où la raison de la recherche également des gènes de virulence de ce pathotype afin d'estimer le risque de contamination de l'homme par la volaille.

La réaction PCR multiplexe a été la technique adoptée pour la recherche des principaux gènes de virulence et sérotypes recherchés.

C'est ainsi que sept (7) gènes de virulence ont été recherchés sur cinquante huit (58) souches d'*E. coli* isolées des cas de colibacilloses aviaires. Parmi les gènes du groupe APEC, les gènes testés étaient *iucD* codant pour l'aérobactine, *tsh* pour l'hémagglutinine sensible à la température, le variant C du gène *pap* codant le fimbriae de type P, et le gène *cnf* codant pour la cytotoxine nécrosante. Pour le groupe des STEC, ce sont les gènes *eae* codant pour les liaisons d'attachement et d'effacement et les gènes *stx1* et *stx2* codant pour les toxines shiga qui ont été recherchés.

Les résultats obtenus ont montré que les gènes de virulence *iucD* (53%) et *tsh* (29%) ainsi que le virotype *iucD-tsh* (26%) suivi par *iucD* (17%) du groupe APEC sont plus largement diffusés dans les *E. coli* isolés de ces cas de colibacillose aviaires avec cependant 40% des souches non virotypables, c'est-à-dire négatives pour les gènes étudiés.

Sur les cinquante huit (58) souches étudiées, une (1) seule souche présentant les gènes de virulence *eae* et *stx1* des STEC a été détectée.

Les sérotypes recherchés étaient O1, O2, O4, O6, O15, O18, O25, O75, et O78. Les résultats ont révélé 79% de souches non sérotypables, autrement dit négatives pour les sérotypes recherchés. Toutefois, il a été démontré que les sérotypes le plus fréquemment rencontrés étaient le sérotype O25 (12%) suivi du sérotype O4 (3%) et enfin des sérotypes O2, O15 et O78 avec chacun une fréquence de 2%. Il a également été noté que le séro-virotype le plus fréquemment rencontré est le séro-virotype O25-*iucD-tsh* (10%).

La résistance de ces souches d'*E. coli* a été également étudiée vis-à-vis de quinze (15) antibiotiques à l'aide de la méthode de diffusion en gélose Mueller Hinton.

Les plus hauts niveaux de résistance ont été observés avec la tétracycline (95%), le sulfisoxazole (90%), l'ampicilline (73%), la streptomycine (71%), l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (62%) et l'acide nalidixique (48%).

Les niveaux de résistance les plus faibles ont été notés pour la kanamycine (7%), la gentamicine (5%) et le ceftiofur (3%).

Aucune résistance n'a été observée pour l'amoxicilline, le ceftriaxone, l'amikacine et la cefoxitine.

Des résistances assez élevées ont été également notées pour les quinolones de 3^e génération pourtant récemment utilisés en aviculture comme la ciprofloxacine (18%) mais aussi pour des antibiotiques interdits en aviculture comme le chloramphénicol (22%).

L'analyse de ces résultats révèle une importante multirésistance. En effet, 88 % des isolats étaient résistants à au moins quatre (4) antibiotiques et un isolat présentait une résistance à neuf (9) antibiotiques.

Les résultats de cette étude nous ont amené à faire des recommandations. Ces dernières vont en direction des pouvoirs publics, des aviculteurs, des vétérinaires et des laboratoires de recherche et de diagnostic.

Les pouvoirs publics doivent veiller au contrôle de l'utilisation des antibiotiques tant en médecine humaine que vétérinaire par le renforcement de la collaboration entre les professionnels de la santé humaine et vétérinaire avec comme objectif la mise en place d'une surveillance des *E. coli* zoonotiques.

Les aviculteurs doivent veiller au respect des normes de biosécurité lors de l'installation des fermes avicoles et des activités de production avec de bonnes pratiques d'élevage mais aussi sur les risques liés à l'automédication.

Nous conseillons aux vétérinaires praticiens d'appliquer une grande rigueur dans la prescription des médicaments et l'instauration d'un traitement après la réalisation d'un antibiogramme. Ils doivent promouvoir un suivi sanitaire régulier des fermes avicoles et une collaboration étroite avec les aviculteurs.

Aux laboratoires de recherche et de diagnostic, nous recommandons d'affiner le diagnostic des colibacilloses aviaires en recherchant les gènes de virulence à l'aide de la PCR. Par ailleurs, le pourcentage important de souches non sérotypables, non virotypables et des cas d'antibiorésistance observé dans notre étude, permet d'envisager la recherche d'autres gènes de virulence, d'autres sérotypes et des gènes de résistances aux antibiotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET WEBOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

1. **ABDEL-AZIZ A., 2007.-** Contribution à la lutte Contre la maladie de Gumboro : détermination du meilleur protocole vaccination à partir des vaccins disponibles sur le marché de Dakar. Thèse : Méd. Vét : Dakar ; 48
2. **AFSSA., 2003. -** Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).- Paris : AFSSA.- 220p.
3. **AMARA A., 1996.-** Données épidémiologiques et épizootiologiques sur les colibacillooses aviaires au Maroc. *Maghreb Vétérinaire*, **8** (32)
4. **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 factor involved in host specificity or zoonotic potential. *Microbial pathogenesis*, **49** : 105-115
5. **BERNARD R., 2007.-** Résistance à la Bacitracine chez *Bacillus subtilis*. Thèse : Microbiologie : Marseille : Université de la Méditerranée
6. **BIAOU F.C., 1995. -** Contribution à l'étude des causes aggravantes de la maladie de Gumboro dans les élevages des poulets de chair de la région de Dakar. Thèse: Méd.Vét : Dakar ; 5
7. **BULDGEN A., DETIMMERMAN F., SALL B. et COMPERE R., 1992. -** Etude des paramètres démographiques et zootechniques de la poule locale dans le bassin arachidier sénégalais .*Revue Elev. Méd.Vét. Pays trop.*, **45** : 341-647
8. **CHAHED A., 2007.-** Prévalence des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines dans les viandes hachées. Thèse : Méd. Vét : Liège : Université de Liège

9. **CHARAF B., 2009.-** Reproduction expérimentale d'une colibacillose chez le poulet
Comparaison de l'efficacité d'une fluméquine et d'une amoxicilline par rapport à une
enrofloxacin de référence dans le traitement de cette pathologie. Thèse : Méd. Vét :
Constantine : Université Mentouri Constantine
10. **CHASLUS – DANCLA E., JULLIOT J.F. et LAFON J.P., 1979. -** Evolution de
l'antibiorésistance dans des élevages avicoles. *Ann. Rech. Vet.*, **10** (1) :77-86
11. **CLERMONT O., JOHNSON J.R., Menard M. et DENAMUR E., 2007.-** Detremination
of *Escherichia coli* O type by allele-specific polymerase chain reaction: application to O
type involved in human septicemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **57**:
129-136
12. **CUEVAS RAMOS G., 2010.-** Effets génotoxiques des souches d'*Escherichia coli*
produisant la Colibactine. Thèse : Méd : Toulouse : Université Toulouse III - Paul Sabatier
13. **DHO-MOULIN M., LAFONT J.P., 1984 -** Adhesive properties and iron uptake ability in
Escherichia coli lethal and non lethal for chicks. *Avian Dis.*, 1984, **28**, 1016-1025
14. **DHO-MOULIN M et FAIRBROTHER J.M., 1999.-** Avian pathogenic *Escherichia coli*
(APEC). *Vet Res.*, **30** (2-3): 299-316
15. **DOYLE M.P et SCHOENI J.L., 1987.-** Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail
fresh meats and poultry. *App Environ Microbiol.*, **53**: 2394-2496
16. **EMERY D.A., NAGARAJA K.V., SHAWD.P., NEWMAN J.A., WHITE D.G., 1992 -**
Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and
turkeys. *Avian Dis.*, 1992, **36**, 504-511.
17. **FAIRBROTHER J.M et NADEAU E., 2006.-** *Escherichia coli*: On-farm contamination
of animals. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Epizooties*, **25** (2) :
555-569
18. **FAO, OMS, et OIE, 2007.-** Réunion des experts mixtes de la FAO/OMS/OIE sur les
agents antimicrobiens d'importance critique : Rapport.- FAO.-84p

- 19. 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 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Letters in Applied Microbiology*, **48** : 692–697
- 20. FLUIT A.C. et VISSER M. R., 2001.-** Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.*, **14** (4) : 836 - 871
- 21. GAY E., JOUY E., CHAZEL M., MEUNIER D., HAENNI M., CALAVAS D. et MADEC J.Y., 2008 -** Apport du Résapath à la problématique de l'antibiorésistance en santé animale: analyse des données recueillies en 2008 sur *Escherichia coli* dans les différentes filières animales. *Bulletin épidémiologique*, **36** : 6 – 9
- 22. GIRARD F., 2005. -** Étude de la pathogénèse des infections à *Escherichia coli* de type attachant et effaçant chez le porc. Thèse : Méd.Vét : Montréal : Université de Montréal
- 23. GROSS W.B.,1991.-** Colibacillosis (138-144) In: Diseases of poultry.- Ames : *Ed. Iowo State University Press*
- 24. HABAMENSHI P. E., 1994.-** Contribution à l'étude des circuits de commercialisation du poulet de chair au Sénégal : Cas de la région de Dakar. Thèse : Méd. Vét : Dakar ; 1
- 25. HASAN B., FARUQUE R., DROBNI M., WALDENSTRÖM J., SADIQUE A., KABIR UDDIN AHMED K., ISLAM Z., HOSSAIN PARVEZ M.B., OLSEN B, et ALAM M., 2011.-** High Prevalence of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Escherichia coli* from Large- and Small-Scale Poultry Farms in Bangladesh. *Avian Diseases*, **55** (4) :689-692
- 26. HUCHE F., 2006.-** Etude structurale et fonctionnelle du récepteur de membrane externe HasR de *Serratia marcescens*, impliqué dans l'acquisition de l'hème via l'hémophore HasA. Thèse : Méd : Microbiologie-Biophysique : Paris : Université de Paris 7., Konstanz : Universite de konstanz

27. JANBEN T., SCHWARZ C., PREIKSCHAT P., VOSS M., PHILIPP H.-C et WIELER L.H., 2001. - Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.*, **291**: 371- 378
28. JEFFREY J.S., NOLAN L.K., TONOOKA K.H. , WOLF.S.,GIDDINGS C.W.,HORM S.M., FOLEY S.L.,LYNNE A.M., EBERT J.O ELIJAH L.M., JORKLUND G.B., PFAFF S.J., DONOUGH M.C.,SINGER R.S. et DOETKOTT C., 2002. -Virulence factors of E coli from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis .*, **46** : 48 – 52
29. JIANG H.X.,LÜ D.H, CHEN Z.L., WANG X.M., CHEN J.R., Liu Y.H., LIAO XP., LIU J.H. et ZENG Z.L., 2011.- High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli*isolates in pigs and poultry in China., *The Veterinary Journal* , **187** (1) : 99 – 103
30. JOHNSON J. R. et T. A. RUSSO., 2002.- Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*:"the other bad *E coli*"., *J Lab Clin Med.*, **139** (3) : 155-162
31. KERN-BERNAIBOUT E.M., 2006.- *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'homme : Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'homme par la contamination de l'environnement. Thèse : Méd. Vét : Toulouse : ENVT
32. KYLIE E., CATHERINE W.G., CURT D, TIMOTHY J.J., MOHAMED K.F., et LISA K.N., 2005.- Comparaison of *Escherichia coli* isolates implicated in humain urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, **151**: 2097- 2110
33. LAFONT J.P., DHO M., D'HAUTEVILLE H.M., BREE A., SANSONETTI P.J., 1987 - Presence and expression of aerobactin genes in virulent strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1987, **55**, 193-197
34. LECOANET., 1992.- Colibacilloses aviaires (237-240) In : Manuel de Pathologie Aviaire. Ed. J. Brugère Picoux et A Silm.- Alfort : Imprimerie du Cercle des Elèves de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.- 381p.

- 35. LEDOUX A.L., 2003.-** Etude de la transmission d'*Escherichia coli* chez la volaille. Thèse : Méd. Vét : Nantes : ENVN ; 3
- 36. LOUKIADIS E., 2007. -** Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement *via* les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC). Thèse : Méd : Toulouse : Université Toulouse III – Paul Sabatier U.F.R S.V.T.
- 37. MAINIL J., 2003.-** La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.*, **147** : 105-126
- 38. MAINIL J et VAN BOST S., 2004.-** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : IV) Souches nécrotoxigènes. *Ann. Méd. Vét.*, **148** : 121-132
- 39. MONTET M.P., 2009.-** Contamination des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France, et importance de l'acido-résistance des souches. Thèse : Méd : Paris: École Pratique des Hautes Études
- 40. MOUGANG F. J., 2008.-** Contribution à la vaccination des volailles contre la maladie de GUMBORO à l'aide de vaccins inactives et vivants disponibles sur le marché de Dakar. Thèse : Méd.Vét : Dakar ; 42
- 41. NAGY B et FEKETE P. Z., 2005.-** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Med Microbiol.*, **295** : 443-54
- 42. NATARO J.P. et KAPER J.B., 1998 -** Diarrheagenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.*, **11**(1) : 142 - 201
- 43. NDAO M., 2011. –** Effets pervers de l'importation des poulets congelés en Afrique : le cas du Sénégal. In: Séminaire international d'échange et de réflexion sur les effets pervers de l'importation massive de poulets congelés en Afrique. Dakar. Sénégal.

44. **NDIAYE C., 2010.-** Etude anatomo-clinique et bactériologique sur des cas suspects de colibacillose aviaire dans les régions de Dakar et Thiès (Sénégal). Thèse. : Méd. Vét : Dakar ; 8
45. **NGELEKA M., BRERETON L., BROWN G. et FAIRBROTHER JM., 2002.-** Pathotypes of Avian *Escherichia coli* as Related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA Sequences, and Antibiotic Sensitivity of Isolates from Internal Tissues and the Cloacae of Broilers. *Avian Dis.*, **46** (1) :143-152
46. **OH JY., KANG MS., KIM JM., AN BK ., SONG EA., KIM JY, SHIN EG., KIM MJ., KWON JH. et KWON YK., 2011.-** Characterization of *Escherichia coli* isolates from laying hens with colibacillosis on 2 commercial egg-producing farms in Korea. *Poult Sci.*, **90**(9):1948-1954
47. **OMS., 1983.-** Résistance aux antimicrobiens. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Sante*, **61** (4): 583 - 595 (1983)
48. **OULON E., 2010. –** Etats des lieux sur les mesures de biosécurité dans les fermes avicoles au Sénégal : cas des départements de Rufisque et Thiès. Thèse : Méd.Vét : Dakar ; 11
49. **SALVADORI M.R., YANO T., CARVALHO H.F., PARREIRAV. R et GYLES C.L., 2001. -**Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* , **45** : 43-51
50. **SANTE CANADA et DIRECTION DES MEDICAMENTS VETERINAIRES, 2002.-** Utilisation au Canada d'antimicrobiens destinés à l'alimentation : les conséquences pour la résistance et la santé humaine : rapport du comité consultatifs sur l'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux et les conséquences pour la résistance et la santé humaine.-Guelph : Université of Guelph ; Santé Canada.- 229p
51. **SENEGAL. Ministère de l'Agriculture., 1995.-** Rapport annuel.-Dakar : DIREL.-64p
52. **SENEGAL. Ministère de l'élevage, 2008.-** Données statistiques sur l'évolution des productions avicoles au Sénégal.-Dakar : DIREL/CNA

- 53. SENEGAL. Ministère de l'Élevage, 2008.-** Filière avicole moderne.-Dakar: CNA.-18p
- 54. SOUILLARD R., TOUX J.Y., LE BOUQUIN S et MICHEL V., 2006.-** Pathologie aviaire en 2004, Données collectées par le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture. *Sciences et Techniques Avicoles* (57)
- 55. STORDEUR P et MAINIL J., 2002.-** La colibacillose aviaire. *Ann. Méd.Vét.*, **146** : 11-18
- 56. SZALO I.M., TAMINIAU B et MAINIL J., 2006.-** Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. *Ann. Méd. Vét.*, **150** : 108-124
- 57. TENO G., 2010.-** Analyse du système de commercialisation du poulet du pays dans le département de Dakar (Sénégal). Mémoire de Master en productions animales et développement durable: Méd. Vét : Dakar ; 03
- 58. TRAORE E. H., 2006.-** Première évaluation de la structure et de l'importance du secteur avicole commercial et familial en Afrique de l'Ouest.- Rome : FAO.- 52 p.
- 59. VAN BAMBEKE F et TULKENS P., 2008.-** Pharmacologie et Pharmacothérapie anti-infectieuse. Syllabus national belge de pharmacologie : Bruxelles.- 202p.
- 60. Villate D., 2001.-** Maladie des volailles. *2^{ème} édition.*, 237-242
- 61. WANG MX., LIAO XP., ZANG WJ., JIANG XH., SUN J., ZHANG MJ., HE XF., LAO D.X. et LIU YH., 2010. -** Prevalence of Serogroups, Virulence Genotypes, Antimicrobial Resistance, and Phylogenetic Background of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in South of China. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7** (9) : 1099 -1106
- 62. WIDMANN S., 2008.-** Intérêt de l'association entre l'enrofloxacin et la colistine ainsi que de l'enrofloxacin et la bromhexine dans le traitement des infections respiratoires aviaires. Thèse : Méd.Vét : Lyon : ENVL

63. YAGUCHI. K., OGITANI, R. OSAWA T., KAWANO M., KOKUMAI N., KANESHIGE T., NORO T., MASUBUCHI K., et SHIMIZU Y., 2007.- Virulence Factors of Avian Pathogenic *Escherichia Coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Japan. *Avian Diseases*, **51**(3):656-662. 2007

WEBOGRAPHIE

64. BOISSIEU C. et GUERIN J.L., 2008.- AVIcampus Ecole Nationale vétérinaire Toulouse., les colibacilloses ou infections à *Escherichia Coli*. [en ligne]. Accès internet : http://www.avicampus.fr/PDF_pathologie/colibacilloses.pdf (page consultée le 30 octobre 2011)

65. ECL (*Escherichia coli* laboratory) : laboratoire de référence de l'OIE pour *Escherichia coli*. [En ligne] Accès internet : www.ecl-lab.ca (Consultée le 13 novembre 2011)

66. FAO., 2006.- Division de la production et de la santé animale de la FAO. Revue du secteur avicole. [en ligne]. Accès internet : <ftp://ftp.fao/docrep/fao/011/ai351f/ai351f00.pdf> (Consultée le 2 novembre 2011)

67. GUERIN J. L. et BOISSIEU C., 2008.- Les colibacilloses ou infections à *Escherichia coli* [en ligne]. Accès internet : http://.wto.org/french/tratop_f/tpr_f/s223_02_f.doc (Consultée le 15 novembre 2011)

68. SENEGAL. Ministère de l'Élevage, 2007.- Statistiques de l'élevage.-Dakar : DIREL.-23p [En ligne] Accès internet : <http://www.gouv.sn> (Consulté le 2 Novembre 2011).

ANNEXE

	Disk diffusion method for antibioresistance			Préparé par : Jahanbakhsh Seyedehameneh
	No du document : ECL-PROC-055	Version 1 2010.11.25	Page : 79/107	Vérifié par : Clarisse Desautels

Zone Diameter Interpretive Chart					
No	Antimicrobial Agent	Disk Potency	Resistant	Intermediate	Susceptible
1	Amikacin (AN)	30µg	≤14	15-16	≥17
2	Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC)	30µg	≤13	14-17	≥18
3	Ampicillin (AM)	10µg	≤13	14-16	≥17
4	Cefoxitin (FOX)	30µg	≤14	15-17	≥18
5	Ceftriaxone (CRO)	30µg	≤13	14-20	≥21
6	Chloramphenicol (C)	30µg	≤12	13-17	≥18
7	Ciprofloxacin (CIP)	5µg	≤15	16-20	≥21
8	Gentamicin (GM)	10µg	≤12	13-14	≥15
9	Kanamycin (K)	30µg	≤13	14-17	≥18
10	Nalidixic acid (NA)	30µg	≤13	14-18	≥19
11	Streptomycin (S)	10µg	≤11	12-14	≥15
12	Sulfisoxazole (G)	250µg	≤12	13-16	≥17
13	Tetracycline (TE)	30µg	≤14	15-18	≥19
14	Trimethoprim-Sulphamethoxazole (SXT)	23.75µg	≤10	11-15	≥16
15	Ceftiofur (XNL)	30µg	≤17	18-20	≥21

SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR

*« Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT,
fondateur de l'enseignement vétérinaire dans le monde, je promets et je
jure devant mes maîtres et mes aînés :*

- ❖ d'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et
de l'honneur de la profession vétérinaire ;*
- ❖ d'observer en toutes circonstances les principes de correction et
de droiture fixés par le code de déontologie de mon pays ;*
- ❖ de prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune
consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on
peut faire ;*
- ❖ de ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la
générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont
permis de réaliser ma vocation.*

Que toute confiance me soit retirée s'il advient que je me parjure ».

LE (LA) CANDIDAT (E)

**VU
LE DIRECTEUR GENERAL
RESPONSABLE
DE L'ECOLE INTER-ETATS
DES SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR**

**VU
LE PROFESSEUR
DE L'ECOLE INTER-ETATS DES
SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR**

**VU
LE DOYEN
DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR**

**LE PRESIDENT
DU JURY**

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER _____
DAKAR, LE _____**

**LE RECTEUR, PRESIDENT DE L'ASSEMBLEE
DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR**

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE DES *ESCHERICHIA COLI* ISOLES DES CAS DE COLIBACILLOSES AVIAIRES AU SENEGAL

RESUME

Au Sénégal, l'intensification de l'aviculture s'accompagne de l'émergence de nouvelles pathologies responsables de fortes mortalités, d'énormes pertes économiques et qui constituent également une préoccupation sanitaire majeure. Parmi ces pathologies on note les colibacilloses aviaires dues aux *E. coli* qui présentent de plus en plus des fréquences de résistance aux antibactériens très élevées avec une tendance nette à la multirésistance.

La présente étude a été menée dans le but de faire une caractérisation phénotypique et génétique des *E. coli* isolés des cas de colibacilloses au Sénégal.

C'est ainsi que les principaux sérotypes, gènes de virulence pour les APEC et les STEC, ainsi que les virotypes de 58 échantillons d'*E. coli* ont été recherchés par PCR multiplexe et leur résistance vis-à-vis de 15 antibiotiques testée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Les résultats de la PCR présentent les gènes *iucD* (53%) et *tsh* (29%) comme étant les gènes de virulence largement diffusés dans les souches *E. coli*, les virotypes largement diffusés étant *iucD-tsh* (26%) et *iucD* (17%). Parmi les sérotypes recherchés, le sérotype O25 (12%) a été le plus prévalent alors que les sérotypes O2 et O78 ont été obtenus dans 2% des cas. Sur les 58 isolats testés, un seul isolat a présenté les gènes *eae* et *stx1* des STEC. Le séro-virotipe O25-*iucD-tsh* (10%) s'est également révélé comme étant le plus prévalent.

Les résultats de l'antibiogramme ont présenté les niveaux de résistance les plus élevés pour la tétracycline (95%), le sulfisoxazole (90%), l'ampicilline (78%), la streptomycine (71%), l'association triméthoprim sulfaméthoxazole (65%) et l'acide nalidixique (48%). Une résistance de 22% a été notée pour le chloramphénicol et 14% pour la ciprofloxacine. En revanche, les antibiotiques tels que la kanamycine, la gentamicine et le ceftiofur ont montré des niveaux de résistance les plus bas avec respectivement 7%, 5% et 3%. Toutefois, aucune résistance n'a été observée pour quatre antibiotiques à savoir l'amoxicilline, le ceftriaxone, l'amikacine et la cefoxitine. L'antibiogramme a également révélé une importante multirésistance. En effet, 88% des isolats étaient résistants à au moins quatre (4) antibiotiques et un (1) isolat présentait une résistance à neuf (9) antibiotiques.

Mots clés : Colibacilloses aviaires- Sérotypes- Gènes de virulence- Résistances aux antibiotiques

Contact: s/c Col Major Soumaila GARBA BP: 893 Niamey/Niger

Tel (00221) 77 5445233/ (00227) 96966136/ (00227) 96967935

E-mail : mimichbsb@yahoo.fr