



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Vétérinaires du Khroub

N° d'ordre :.....

Série :.....

Mémoire
Présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Magister en Médecine Vétérinaire
Option: Pathologie
Spécialité: Aviculture et Pathologie Aviaire

Par : LEZZAR Nawel

Thème:

***Influence d'un traitement oral à la fluméquine
sur la résistance aux quinolones
des souches d'Escherichia coli
dans la flore fécale du poulet de chair***

Soutenu le 01 / 07 / 2006

Jury de soutenance :

Président :	Pr F. SMATI	Professeur	Faculté de Médecine - Université de Constantine
Rapporteur :	Dr A. BENMAKHOUF	Maître de conférences	Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université de Constantine
Examineurs :	Pr K. BENLABED	Professeur	Faculté de Médecine - Université de Constantine
	Pr Y. HAMDI PACHA	Professeur	Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université de Constantine

Année universitaire:2005-2006

SOMMAIRE

INTRODUCTION

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

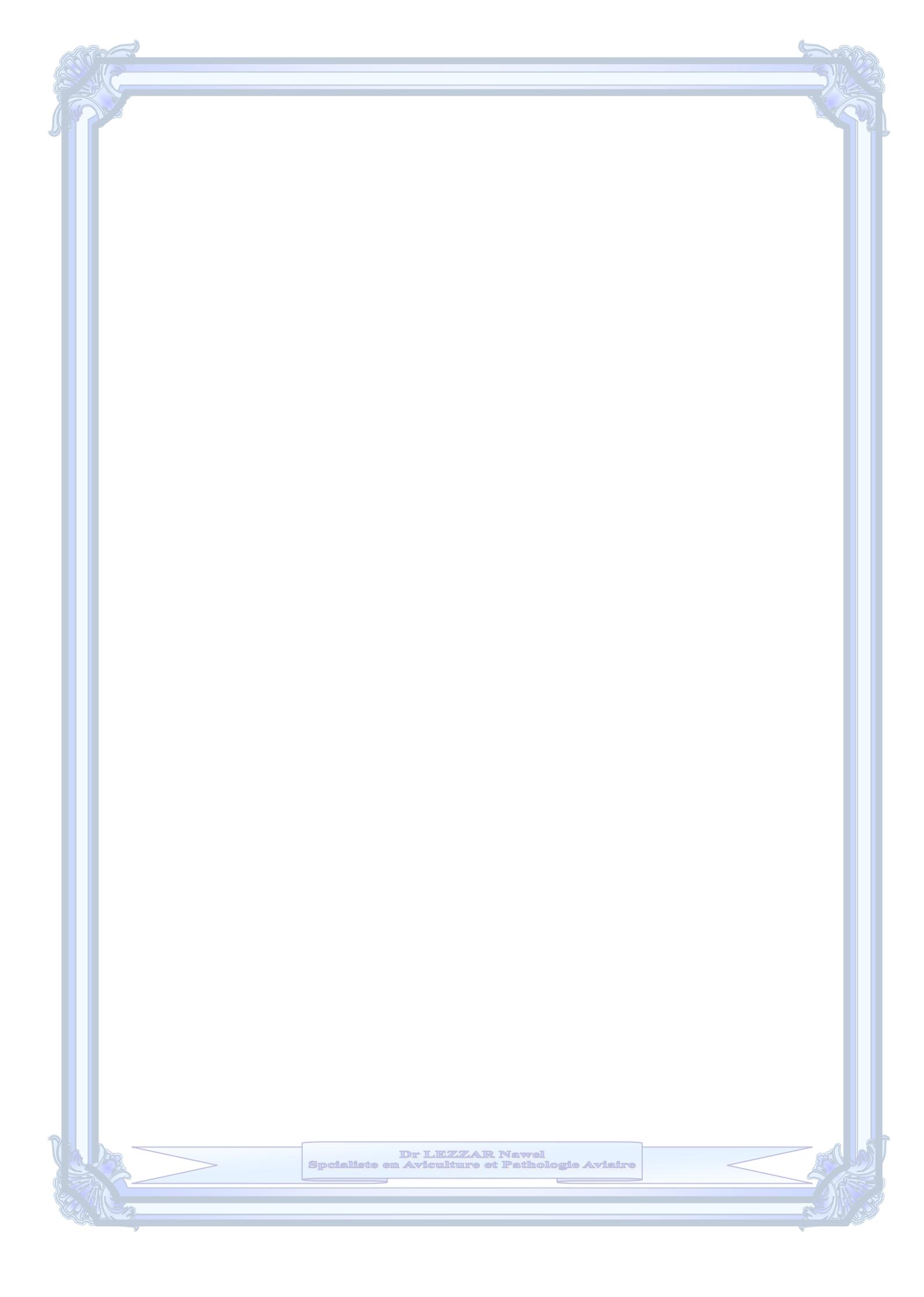
1. APPROCHE BACTERIOLOGIQUE SUR LES <i>ESCHERICHIA COLI</i>	1
1.1 GENERALITES	1
1.1.1 Présentation Générale Des Bactéries	1
1.1.2 Structure Générale Des Bactéries	3
1.1.2.1 La paroi	4
1.1.2.2 La membrane cytoplasmique	5
1.1.2.3 Le cytoplasme	6
1.1.2.4 Le matériel nucléaire	6
1.1.2.5 La capsule	7
1.1.2.6 Les flagelles	7
1.1.2.7 Les pili	8
1.1.2.8 Les plasmides	8
1.1.3 Bactéries Et Antibiotiques	9
1.1.3.1 Mécanismes d'action des antibiotiques	9
1.1.3.2 Mécanismes de résistances des bactéries	10
1.1.3.3 Le support génétique de la résistance aux antibiotiques	11
1.2 LES ENTEROBACTERIES	13
1.2.1 Caractères Généraux	13
1.2.1.1 Morphologie et structure	14
1.2.1.2 Culture	15
1.2.1.3 Caractères biochimiques	15
1.2.1.4 Caractères antigéniques	16
1.2.2 Entérobactéries Et Antibiotiques	18
1.2.2.1 Résistances naturelles	18
1.2.2.2 Résistances acquises	19
1.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	21
1.3.1 Définition	21
1.3.2 Caractéristiques	22
1.3.2.1 Habitat	22
1.3.2.2 Bactériologie	22
1.3.2.3 Antigènes	22
1.3.3 Facteurs De Pathogénicité	23
1.3.4 Pouvoir Pathogène	24
1.3.4.1 Infections de l'appareil urinaire	24
1.3.4.2 Infections abdominales	24
1.3.4.3 Bactériémies	24
1.3.4.4 Le choc endotoxinique	24
1.3.4.5 Syndromes diarrhéiques	25
1.4 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A COLIBACILLES	26
1.5 RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	27
2. APPROCHE CLINIQUE SUR LES <i>ESCHERICHIA COLI</i> OU LES COLIBACILLOSES CHEZ LE POULET DE CHAIR	28
2.1 INTRODUCTION	28
2.2 HISTORIQUE	29
2.3 EPIDEMIOLOGIE	29

2.3.1 Etiologie	29
2.3.2 Transmission	30
2.4 CARACTERISTIQUES DES SOUCHES PATHOGENES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i>	31
2.4.1 Sérotypes	31
2.4.2 Facteurs De Virulence	32
2.4.2.1 Pili (facteur d'adhésion)	32
2.4.2.2 Le système aérobactine	32
2.4.2.3 Antigène capsulaire (K1)	33
2.5 LES DIFFERENTES ENTITES PATHOLOGIQUES	33
2.5.1 Mortalité Embryonnaire (Yolk Sac Infection)	33
2.5.2 Mortalité Du Jeune Poussin (Omphalite)	34
2.5.3 Colibacillose Respiratoire (Aérosacculite)	34
2.5.4 Colisepticémie	34
2.5.5 Salpingite Et Ovarite	35
2.5.6 Péritonite	35
2.5.7 Entérite	36
2.5.8 Coligranulomatose (Maladie De Hjarre)	36
2.5.9 Swollen Head Syndrome (S.H.S.)	36
2.5.10 Dermatite Nécosante (Cellulitis)	36
2.5.11 Arthrites Et Synovites	37
2.6 DIAGNOSTIC	37
2.7 TRAITEMENTS ET PROPHYLAXIE	38
2.7.1 Traitement	38
2.7.2 Prophylaxie	38
3. APPROCHE PHARMACOLOGIQUE SUR LES QUINOLONES	40
3.1 GENERALITES	40
3.2 CLASSIFICATION	41
3.3 STRUCTURE	44
3.3.1 Composition Chimique	44
3.3.2 Proprietes Physico-Chimiques	45
3.4 PHARMACOCINETIQUE	46
3.4.1 Resorption	46
3.4.2 Distribution	46
3.4.3 Demi-Vie	46
3.4.4 Metabolisme (Biotransformation)	46
3.4.5 Elimination	47
3.5 ACTIVITES THERAPEUTIQUES (ANTIBACTERIENNE)	47
3.5.1 Spectre D'activité	47
3.5.2 Mécanisme D'action	47
3.5.3 Rôle Des Topoisomérases De Type II (ou ADN-Gyrase) Et De Type IV	48
3.5.4 Mode D'action	48
3.6 INDICATIONS ET CONTRE INDICATIONS THERAPEUTIQUES	49
3.6.1 Indications Thérapeutiques	49
3.6.2 Contre-indications Thérapeutiques	50
3.7 TOXICITE-RESIDUS ET TEMPS D'ATTENTE	50
3.7.1 Toxicite	50
3.7.2 Résidus Et Temps D'attente	50
3.8 FORMES, VOIES D'ADMINISTRATION ET POSOLOGIE	50
3.8.1 Formes Et Voies D'utilisation	50

3.8.2 Posologie	51
3.9 MECANISMES DE RESISTANCE AUX QUINOLONES	51
3.9.1 Les Résistances Intrinsèques (Naturelles)	52
3.9.2 Les Résistances Extrinsèques (Acquises)	52
3.9.2.1 Modification de la DNA-Gyrase	52
3.9.2.2 Modification de la topoisomérase IV	53
3.9.2.3 Autres mécanismes de la résistance	54
3.9.2.4 Expression de la résistance	55
ETUDE EXPERIMENTALE	
1. OBJECTIFS DE L'ETUDE	56
2. GENERALITES	56
2.1 APPROCHE EXPERIMENTALE	56
2.2 ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL	57
MATERIELS ET METHODES	
AU NIVEAU DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL	
1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	58
1.1 LES ANIMAUX	58
1.2 HEBERGEMENT DES ANIMAUX	58
1.3 REPARTITION DES ANIMAUX	58
1.4 LES PRELEVEMENTS	63
1.4.1 Réalisation Des Prélèvements De Fientes	63
1.4.2 Identification Des Prélèvements	63
1.5 INOCULATION D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> (O78 :K80)	64
1.5.1 Souche D' <i>Escherichia coli</i>	64
1.5.2 L'inoculum	64
1.5.2.1 L'inoculum d'essai	65
1.5.2.2 L'inoculum final	65
1.6 CRITERES D'ETUDE DU PROTOCOLE THERAPEUTIQUE (TRAITEMENT)	66
1.6.1 Produits A L'étude	66
1.6.2 Schéma Du Traitement (Protocole Thérapeutique Proprement Dit)	67
1.6.3 Dose Réelle Du Traitement	68
1.7 CRITERES D'ETUDE DU PROTOCOLE CLINIQUE	68
1.7.1 Croissance Des Animaux	68
1.7.2 Consommation D'eau Et D'aliment	68
1.7.3 Morbidite	69
1.7.4 Score Symptomatique	69
1.7.5 Mortalité	69
1.7.6 Score Lésionnel	70
2. CHOIX DES PARAMETRES DU PROTOCOL EXPERIMENTAL.	70
2.1 CHOIX DE L'ECHANTILLON	70
2.1.1 La Souche Animale	70
2.1.2 L'effectif (Le Nombre)	70
2.1.3 Le Sexe Et L'age	71
2.2 CHOIX DE LA SOUCHE PATHOGENE ET DE SON INOCULATION	72
2.2.1 La Souche Bacterienne	72
2.2.2 La Voie D'inoculation	72
2.2.3 La Période	73
2.3 CHOIX DE L'ANTIBACTERIEN ET DE SON ADMINISTRATION	73
2.3.1 L'antibactérien	73

2.3.2 La Voie D'administration	74
2.3.3 Le Mode D'administration	74
2.3.4 La Durée Du Traitement	74
AU NIVEAU DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE	94
1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	94
2. MATERIELS	96
2.1 EQUIPEMENT DE LABORATOIRE	96
2.2 MATERIELS DE LABORATOIRE	97
2.2.1 Pour La Préparation De L'inoculum	97
2.2.2 Pour L'étude Des Caractères Morphologiques, Culturels Et Biochimiques	97
2.2.3 Pour Le Sérotypage	97
2.2.4 Pour L'antibiogramme	97
2.3 PRODUITS ET REACTIFS	98
2.3.1 Pour La Préparation De L'inoculum	98
2.3.2 Pour Le Sérotypage	98
2.3.3 Pour La Coloration De Gram	98
2.3.4 Pour La Galerie Biochimique Classique	98
2.3.5 Pour La Galerie Biochimique API 20 E	99
2.3.6 Pour L'antibiogramme	99
2.4 MILIEUX DE CULTURE	99
2.4.1 Les Milieux D'isolement	100
2.4.1.1 Les milieux liquides (les bouillons = broth)	100
2.4.1.2 Les milieux solides (les géloses = agar)	100
2.4.2 Les Milieux D'identification	103
2.4.2.1 Les milieux liquides (les bouillons = broth)	103
2.4.2.2 Les milieux solides (les géloses = agar)	105
2.4.2.3 La galerie API 20 E (BIOMERIEUX)	107
2.4.3 Le Milieu De Conservation	107
2.4.4 Le Milieu Pour L'antibiogramme	107
3. METHODES	108
3.1 LES MANIPULATIONS POUR LA PREPARATION DE L'INOCULUM	109
3.1.1 A Partir D'un Titre Initial Et D'une Numération Bactérienne Correspondante	109
3.1.2 A Partir D'une Numération Bactérienne	109
3.1.2.1 La numération de l'inoculum par étalonnage photométrique	109
3.1.2.2 La numération de l'inoculum par comptage sur milieu gélose	110
3.1.3 Premier Protocole De Dilution	111
3.1.4 Deuxième Protocole De Dilution	114
3.1.5 Troisième Protocole De Dilution	117
3.1.6 Quatrième Protocole De Dilution	121
3.1.6.1 Préparation de l'inoculum d'essai	121
3.1.6.2 Préparation de l'inoculum final	125
3.2 LES MANIPULATIONS D'ISOLEMENT	126
3.2.1 L'enrichissement	126
3.2.2 L'ensemencement	127
3.2.3 L'isolement	129
3.2.4 Le Ré-Isolement	130
3.2.5 Le Repiquage	130
3.3 LES MANIPULATIONS D'IDENTIFICATION	131
3.3.1 La Recherche Des Caractères Morphologiques	131

3.3.2 La Recherche Des Caractères Cultureux	132
3.3.3 La Recherche Des Caractères Biochimiques	135
3.3.3.1 Réalisation d'une mini galerie classique	135
3.3.3.2 Réalisation de la galerie API 20 E	148
3.3.4 La Recherche Des Caractères Antigéniques	152
3.4 LES MANIPULATIONS DE CONSERVATION	158
3.5 LES MANIPULATIONS POUR LA REALISATION DE L'ANTIBIOGRAMME	158
RESULTATS	
AU NIVEAU DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL	194
1. L'ELEVAGE EXPERIMENTAL	194
2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	195
3. PROTOCOLE THERAPEUTIQUE	196
4. PROTOCOLE CLINIQUE	196
4.1 SYMPTOMES ET LESIONS	196
4.1.1 Score Symptomatique	196
4.1.2 Score Lésionnel	196
4.2 MORTALITE	197
4.3 AUTOPSIE	197
AU NIVEAU DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE	209
1. LES PRELEVEMENTS	209
1.1 JOURS DE PRELEVEMENT DE LA FLORE FECALE	209
1.2 LES PRELEVEMENTS EFFECTUES	209
2. LA FLORE FECALE	209
2.1 IDENTIFICATION DE LA FLORE FECALE ET RECHERCHE D' <i>ESCHERICHIA COLI</i>	209
2.2 LES GERMES RECHERCHES	210
3. LE SEROTYPAGE	210
3.1 IDENTIFICATION DES SOUCHES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> PAR LE TEST SEROLOGIQUE	210
3.2 LE TEST SEROLOGIQUE	210
4. L'ANTIBIOGRAMME	210
4.1 IDENTIFICATION DES SOUCHES RESISTANTES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> PAR L'ANTIBIOGRAMME	210
4.2 L'ANTIBIOGRAMME	210
DISCUSSION	
AU NIVEAU DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL	216
1. DISCUSSION DES CRITERES D'ETUDE RECUEILLIS LORS DU TEST D'INOCULATION (INOCULUM D'ESSAI)	216
2. DISCUSSION DES CRITERES D'ETUDE RECUEILLIS LORS DE L'INOCULATION PROPREMENT DITE (INOCULUM FINAL)	216
AU NIVEAU DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE	219
1. DISCUSSION DES RESULTATS DU TEST SEROLOGIQUE	219
2. DISCUSSION DES RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME (IN VITRO)	220
3. DISCUSSION DES RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME (IN VIVO)	220
CONCLUSION	
ANNEXES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
EL MOULAKHAS	
SUMMARY	
RESUME	



Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

INTRODUCTION

Les bactéries possèdent des mécanismes de résistances variées et plus ou moins spécifiques aux différents antibiotiques. Cette résistance représente un facteur menaçant les élevages à grands effectifs car la présence de bactéries résistantes (dans la flore digestive), d'une part, empêche le succès thérapeutique des antibiotiques mis en place lors d'apparition de pathologies ; et d'autre part, entraîne une possibilité de transmission de ses gènes à l'homme.

Escherichia coli ou colibacille est habituellement une bactérie commensale du tube digestif, il peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si il acquiert des facteurs de virulence particuliers. Chez la volaille, il est responsable de colibacilloses aviaires considérées comme des maladies infectieuses majeures responsables de lourdes pertes économiques et faisant l'objet de saisie au niveau de l'abattoir.

Escherichia coli est généralement sensible aux antibiotiques, cependant, beaucoup de souches d'*E. coli* ont acquis des résistances et leur sensibilité aux antibiotiques se trouve modifiée.

Devant la diversité des souches d'*E. coli* aviaires et les pathologies qu'elles engendrent, et pour lutter efficacement contre la colibacillose aviaire, une antibiothérapie ciblée faisant appel aux quinolones et une prophylaxie adéquate sont à l'heure actuelle les seuls moyens de lutte.

L'intérêt d'étudier ces molécules est d'évaluer leur éventuelle baisse d'activité. Sachant que la flore digestive constitue un réservoir de bactéries résistantes du fait qu'elle soit soumise à la présence de l'antibiotique lors d'un traitement ; il est important de se tracer l'objectif suivant : décrire la résistance aux quinolones chez *Escherichia coli* de la flore fécale, dans un élevage avicole de poulet de chair, dans un contexte d'utilisation de ces molécules en prenant à titre d'exemple la fluméquine qui est le traitement de choix contre les colibacilles (et l'enrofloxacin à titre comparatif).

L'étude visant à analyser l'impacte d'un traitement oral aux quinolones (fluméquine et enrofloxacin) sur l'émergence de souches résistantes d'*Escherichia coli* dans la flore fécale du poulet de chair, tente de mettre en évidence les souches concernées par cette antibiorésistance et d'expliquer les raisons de leur apparition.

1. APPROCHE BACTERIOLOGIQUE SUR LES *ESCHERICHIA COLI*

Dans cette approche bactériologique, on abordera en premier les entérobactéries auxquelles appartiennent les *Escherichia coli*, avant d'étudier ces dernières ; Mais tout d'abord, commençant par un petit rappel sur les bactéries.

1.1 GENERALITES

1.1.1 PRESENTATION GENERALE DES BACTERIES

Les bactéries sont des organismes unicellulaires dont les dimensions sont de l'ordre du micromètre; on doit donc utiliser un microscope pour les observer.

Vers 1665, un hollandais, Antoine Van Leeuwenhoek, fabrique le premier microscope en superposant des lentilles dans le but d'observer les textiles. Esprit curieux, il observe à l'aide de cet instrument des particules provenant de la surface de sa peau, de sa bouche ou de ses dents et les dessine. Il découvre et décrit le monde microbien.

Les organismes vivants contiennent des organes constitués de tissus faits de la juxtaposition de cellules. La cellule est une structure physique qu'on retrouve chez tous les êtres vivants. Elle possède un cytoplasme et un noyau limités l'un et l'autre par une membrane cytoplasmique ou nucléaire. (Euzeby, 2004)

Des différences morphologiques importantes existent entre cellules des règnes végétal et animal mais la place des bactéries restait mal précisée jusqu'à ce que Haeckel, en 1866, proposa la création d'un troisième règne, celui des "PROTISTES".

Le règne des protistes est scindé en deux groupes :

- Les protistes supérieurs, tels que les algues, les champignons et les protozoaires, possèdent, comme les plantes et les animaux, une organisation cellulaire complexe caractérisée principalement par l'existence d'un noyau : ce sont les cellules eucaryotes.
- Les protistes inférieurs, constitués par les bactéries, sont formés d'une cellule unique dépourvue de noyau : ce sont les cellules procaryotes. (Fung, 1987 ; Villate, 2001 a ; Euzeby, 2004)

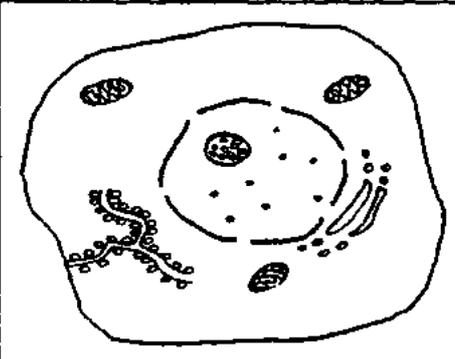
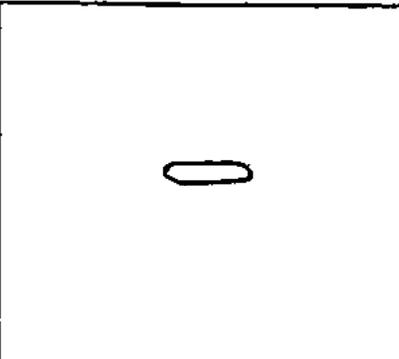
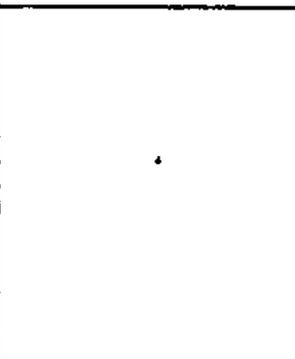
		
15 μm	2,5 μm	150 nm
leucocyte	colibacille	herpès
EUCARYOTE	PROCARYOTE	VIRUS
DNA = 1 μm de long	DNA = 1 mm de long	DNA = 35 μm long

Figure 1 : Différents types de cellules. (Euzeby, 2004)

Le microscope optique nous donne une image (grossit 1000 fois) des bactéries dont la taille est de l'ordre du micromètre (μm). On distingue ainsi des bactéries aux formes variées:

- Des formes rondes ou coques (*coccus* en latin, au pluriel *cocci*),
- Des formes allongées en bâtonnet ou bacilles,
- Des formes intermédiaires ou coccobacilles,
- Des formes plus ou moins spiralées. (Fung, 1987 ; Euzeby, 2004)

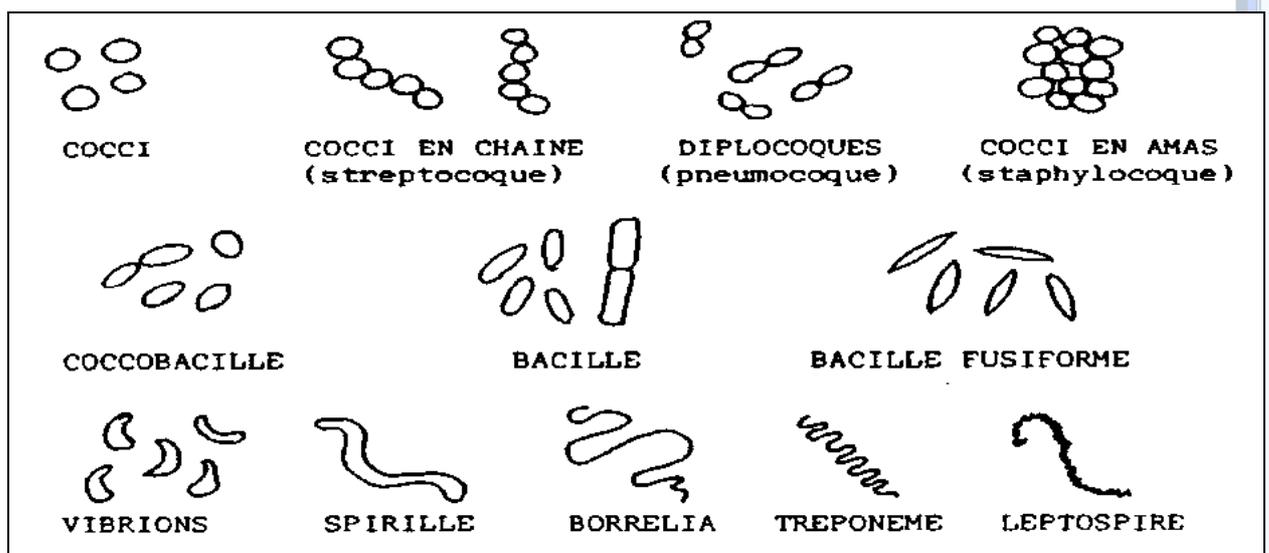


Figure 2 : Différentes formes de bactéries. (Euzeby, 2004)

L'étude au microscope de la morphologie bactérienne ne fournit pas de renseignements très détaillés mais présente cependant un intérêt considérable car elle constitue la première étape de toute identification bactérienne. Elle est réalisée plusieurs fois par le laboratoire de diagnostic au cours de l'identification d'une bactérie car elle est suffisamment spécifique pour permettre une orientation préliminaire du diagnostic et elle permet de vérifier la pureté d'une souche, préalable obligatoire à une identification. Les morphologies les plus typiques sont observées dans des cultures jeunes effectuées en milieu liquide. Trois critères sont pris en compte : la taille, la forme et le mode d'assemblage. (Euzéby, 2004)

1.1.2 STRUCTURE GENERALE DES BACTERIES

La connaissance des différentes structures des bactéries est nécessaire pour comprendre leur métabolisme. Certaines de ces structures sont permanentes, d'autres inconstantes. La structure fine des bactéries a été mise en évidence grâce à la microscopie électronique sur coupes ultrafines. Il est classique de distinguer des structures obligatoires, présentes chez toutes les bactéries et des structures dont la présence est facultative et caractérise des groupes bactériens. (Villate, 2001 a ; Euzéby, 2004)

Les composants obligatoires sont constitués par le cytoplasme qui a généralement une structure homogène et renferme essentiellement des ribosomes. Dans le cytoplasme, l'appareil nucléaire ou "chromosome" a un aspect fibrillaire, il occupe une place importante et n'est pas entouré par une membrane. La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme et possède la structure classique avec deux feuillets phospholipidiques contenant des protéines. À l'extérieur de la membrane cytoplasmique on trouve très généralement la paroi dont la structure est variable selon les groupes de bactéries et qui forme une enveloppe rigide.

Les composants facultatifs sont des polymères de surface comme la capsule, des appendices comme les flagelles et les pili ou des structures génétiques comme les molécules d'ADN extrachromosomiques appelées plasmides et les éléments génétiques transposables (en fait de très nombreuses bactéries possèdent des plasmides et des éléments génétiques transposables). Ils existent également d'autres éléments (comme la spore), mais nous ne citons que ceux qui concernent les entérobactéries en général et les *Escherichia coli* en particulier. (Ryter, 1989 ; Villate, 2001 a ; Euzéby, 2004)

1.1.2.1 La Paroi

Elle est présente chez toutes les espèces bactériennes à l'exception des mycoplasmes. Elle entoure la bactérie et constitue la structure constante la plus externe.

On rencontre deux types de paroi :

Les parois épaisses et denses

Elles sont faites presque uniquement de peptidoglycane ou muréine ou mucopeptide. Cette substance à structure lamellaire est faite de chaînes de polysaccharides reliées entre elles par des peptides ; lui sont associés des acides téichoïques.

Les parois fines et lâches

Elles ont une structure plus complexe constituée d'une fine couche de mucopeptide (à structure plus lâche que celle des parois épaisses) recouverte à l'extérieur d'une membrane externe ou pariétale. Cette paroi est séparée de la membrane cytoplasmique par un espace appelé espace périplasmique. (Ryter, 1989 ; Villate, 2001 a ; Euzéby, 2004)

La membrane externe a la structure de toutes les membranes cellulaires. Elle est faite de lipides (phospholipides et lipopolysaccharides) organisés en deux couches hydrophiles séparées par une couche hydrophobe. Dans l'épaisseur de cette membrane sont enchâssées des protéines, les porines, qui permettent le passage de petites molécules telles que les antibiotiques. Les lipopolysaccharides les plus externes portent les antigènes O des bactéries et constituent l'endotoxine des bactéries. (Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Villate, 2001 a ; Euzéby, 2004)

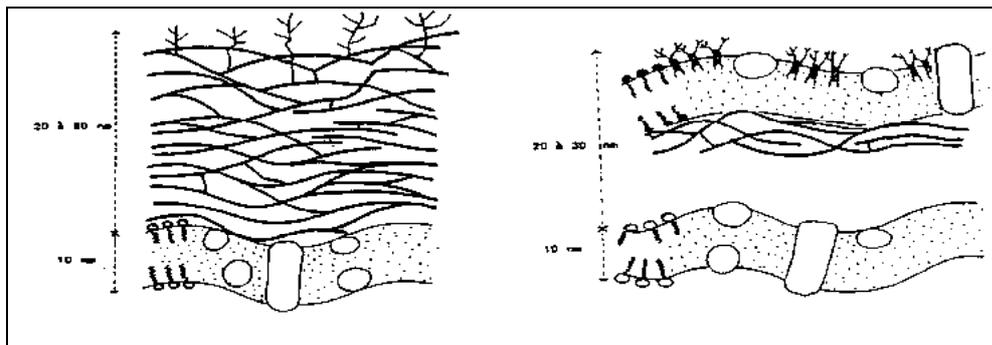


Figure 3 : Paroi bactérienne épaisse à gauche et fine à droite. (Euzéby, 2004)

La paroi détermine la forme de la bactérie, elle la protège (une bactérie qui n'a plus de paroi meurt) et est un passage obligé pour les échanges avec le milieu extérieur ; elle est antigénique (antigène O).

La paroi est la cible d'antibiotiques telles que les bêta-lactamines qui bloquent sa synthèse.

La coloration de Gram permet de séparer les bactéries à paroi épaisse des bactéries à paroi fine : Après fixation des bactéries sur une lame porte-objet, on traite la préparation par un premier colorant : le "violet de gentiane" puis on mordance par une solution de lugol. A ce stade, toutes les bactéries apparaissent violet. On lave la préparation avec de l'alcool qui décolore les seules bactéries à paroi fine qui ne sont donc plus visibles. On surcolore par de la fuchsine (colorant rouge) qui recolore les bactéries décolorées. Après coloration de Gram, les bactéries à paroi épaisses sont colorées en violet : elles sont dites "à Gram positif", les bactéries à paroi fine sont colorées en rose : ce sont les bactéries "à Gram négatif". (Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Villate, 2001 a ; Euzeby, 2004)

1.1.2.2 La Membrane Cytoplasmique

La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme, elle a la structure lipidoprotidique de toutes les membranes cellulaires.

Les molécules qui la constituent sont mobiles et "flottent" dans son épaisseur lui donnant une grande plasticité. Parmi les diverses protéines, certaines sont constitutives, d'autres ont un rôle de transport permettant le passage de diverses molécules ou ions (Na, K, Cl, sucres, aminoacides ou oligopeptides). Elle contrôle donc les entrées et sorties de la cellule.

La membrane cytoplasmique des bactéries contient en outre de nombreux enzymes assurant les synthèses et fournissant l'énergie nécessaire au métabolisme. La membrane assure les fonctions des mitochondries, qui n'existent pas chez les bactéries.

La membrane est la cible des antibiotiques polypeptidiques. (Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Villate, 2001 a ; Euzeby, 2004)

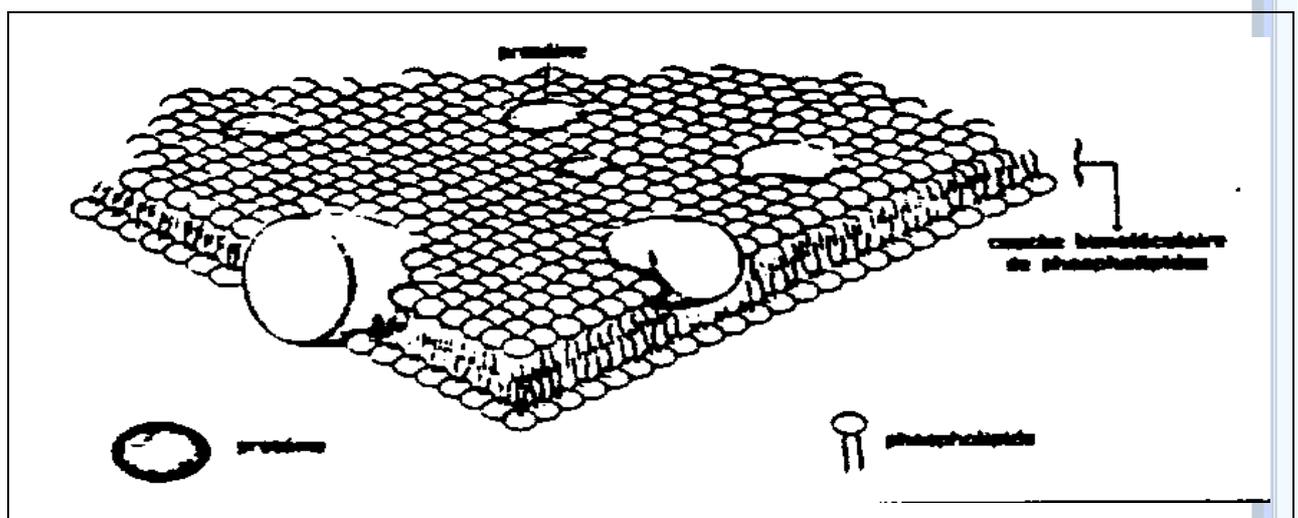


Figure 4 : Membrane cytoplasmique d'une bactérie. (Euzeby, 2004)

1.1.2.3 Le Cytoplasme

Il contient essentiellement les ribosomes qui assurent les synthèses protéiques en traduisant le m-RNA. Ils sont en étroit contact avec le matériel nucléaire. Les ribosomes des bactéries sont différents des ribosomes des eucaryotes. Ils sont la cible de nombreux antibiotiques. (Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Villate, 2001 a ; Euzeby, 2004)

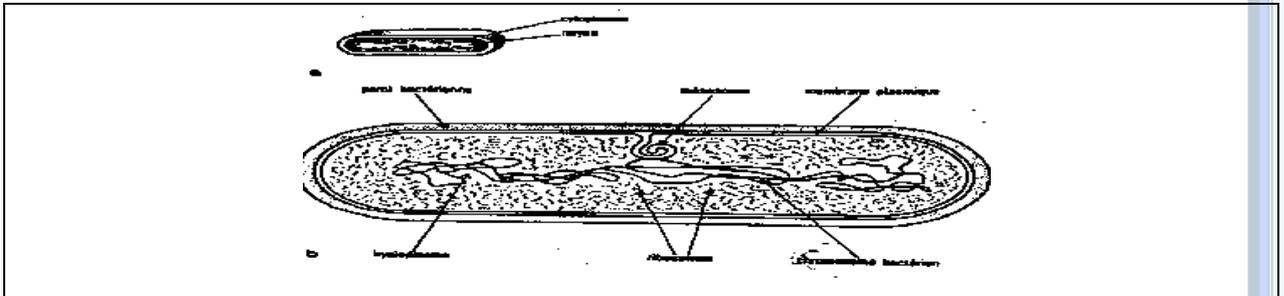


Figure 5 : Cytoplasme bactérien. (Euzeby, 2004)

1.1.2.4 Le Matériel Nucléaire

Les cellules procaryotes ne possèdent pas de noyau mais possèdent du matériel nucléaire sous forme d'un chromosome unique, circulaire, d'une longueur voisine de 1 mm (1 360 μm chez *Escherichia coli*). Ce chromosome est constitué d'un filament hélicoïdal d'acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire. Chaque chaîne est faite d'une succession d'acide phosphorique et de désoxyribose sur lequel est branché une base. Quatre bases entrent dans la composition de l'ADN : adénine (A), guanine (G), thymine (T) et cytosine (C). Les deux chaînes, liées entre elles par les bases, ont la même structure mais chaque base détermine obligatoirement la base opposée car à l'adénine ne peut se lier que la thymine et à la guanine, la cytosine (A-T, G-C). La séquence de ces bases est spécifique de chaque ADN.

L'ADN des bactéries est le support des informations transmises aux ribosomes qui effectuent les synthèses. (Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Pelmon, 1993 (c) ; Villate, 2001 a ; Euzeby, 2004)

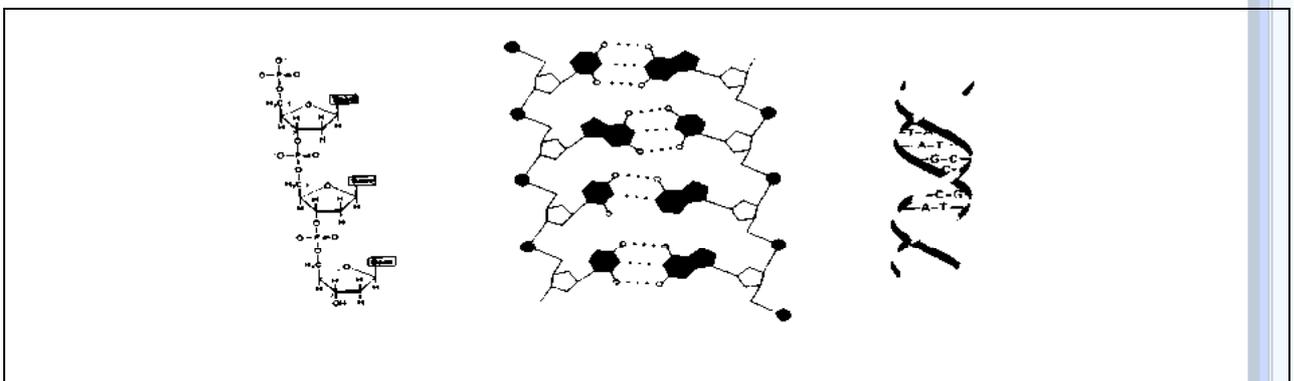


Figure 6 : Matériel nucléaire d'une bactérie. (Euzeby, 2004)

1.1.2.5 La capsule

La capsule est une structure extérieure non constante. Elle entoure la bactérie. Sa constitution est le plus souvent polysaccharidique, parfois protéique. Elle n'est pas colorable par les techniques bactériologiques. Pour la mettre en évidence au microscope, on réalise une suspension des bactéries dans de l'encre de chine et on observe la capsule sous forme d'un halo clair et réfringent. C'est un facteur de virulence car elle protège la bactérie de la phagocytose.

La capsule est antigénique, les antigènes capsulaires sont dénommés **antigène K**. (Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Villate, 2001 a ; Euzeby, 2004)

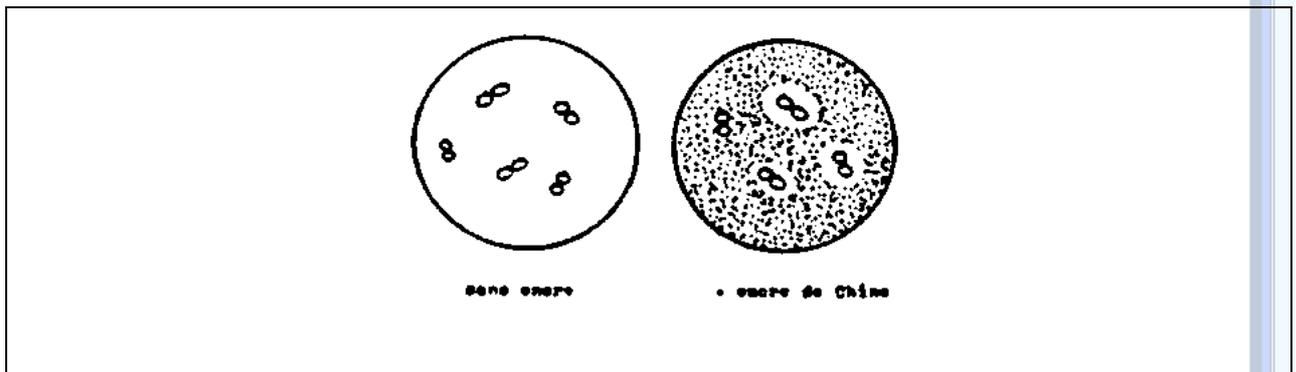


Figure 7 : Capsule bactérienne. (Euzeby, 2004)

1.1.2.6 Les Flagelles

Les flagelles ou cils sont des structures rigides, ondulées qui naissent de la membrane cytoplasmique. Ils permettent la mobilité des bactéries et seules les espèces qui en sont pourvues sont mobiles. Ils sont constitués d'une protéine appelée flagelline.

Plusieurs dispositions sont possibles :

- un seul flagelle polaire = ciliature monotriche,
- une touffe de flagelles polaires = ciliature lophotriche,
- un flagelle à chaque pôle = ciliature amphitriche,
- des flagelles entourant la bactérie = ciliature péritriche.
- les spirochètes ont un flagelle interne dénommé filament axial.

Les antigènes des flagelles sont appelés **Antigène H**. (Fung, 1987 ; Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Villate, 2001 a ; Euzeby, 2004)

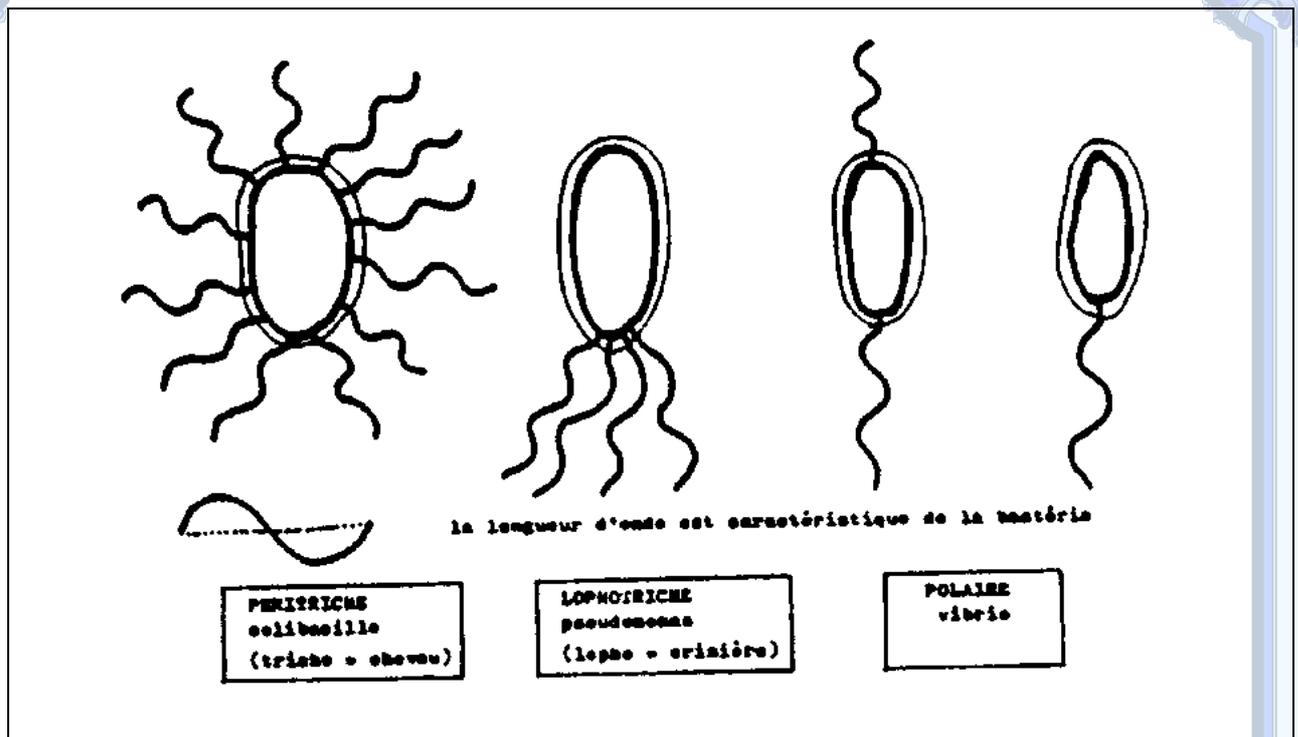


Figure 8 : Différentes dispositions des flagelles. (Euzéby, 2004)

1.1.2.7 Les Pili

Les pili (poils) sont des formations qu'on ne peut observer qu'au microscope électronique. Certains d'entre eux, dénommés pili communs ou fimbriae (frange) sont courts et cassants. Ils sont utiles pour l'adhésion des bactéries aux interfaces et particulièrement aux muqueuses et sont donc des facteurs de virulence. Ils ont une structure protéique : la piline.

Les pili sexuels, plus longs, relient deux bactéries et sont des voies d'échanges de matériel génétique entre les bactéries. Les bactéries capables de produire des pili sexuels sont dénommées bactéries "mâles" à l'opposé des autres qui sont dites "femelles". (Ryter, 1989 ; Spicer, 1992 ; Villate, 2001 a ; Euzéby, 2004)

1.1.2.8 Les Plasmides

Les plasmides sont de petits éléments circulaires constituant du matériel génétique extra-chromosomique. Ils sont faits d'ADN et portent, comme le chromosome, des informations génétiques. Ils sont autonomes et capables de se répliquer indépendamment du chromosome. Ils codent pour la synthèse de différentes protéines enzymatiques conférant ainsi à la bactérie qui les possède des caractères particuliers tels que : possibilité d'utiliser tel ou tel substrat ou résistance aux antibiotiques. Ces plasmides sont transmissibles à d'autres bactéries. (Euzéby, 2004)

1.1.3 BACTERIES ET ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique élaborés par des microorganismes (champignons et diverses bactéries) ou synthétiques (dérivés semi synthétiques). Comme leur nom l'indique, ils vont s'opposer aux bactéries, soit en inhibant leur croissance et leur reproduction sans les tuer (effet bactériostatique), soit en les détruisant (effet bactéricide). Pour chaque action existe une réaction : les bactéries face aux assauts de plus en plus fort des antibiotiques vont développer des moyens de résistance, d'où le terme d'antibiorésistance ; Les uns comme les autres agissent selon des mécanismes bien précis.

1.1.3.1 Mécanismes D'action Des Antibiotiques

Pour qu'un antibiotique soit actif sur une bactérie, il faut :

- Qu'il traverse la paroi,
- Qu'il ne soit ni modifié ni détruit,
- Qu'il se fixe à une cible. (Euzeby, 2005 b)

Qu'il traverse la paroi

La paroi des bactéries à Gram positif est relativement perméable à la plupart des antibiotiques.

La paroi des bactéries à Gram négatif est en règle générale beaucoup moins perméable à cause de la membrane extérieure. La structure de cette membrane varie selon les espèces expliquant la perméabilité relative des cocci à Gram négatif. (Spicer, 1992 ; Euzeby, 2005 b)

La traversée de la membrane extérieure dépend des caractéristiques de la molécule telles que la taille, la solubilité et sa charge électrique. Ainsi les aminosides sont hydrosolubles et pénètrent par la voie des porines mais ils sont aussi chargés positivement ce qui leur permet de s'introduire en désorganisant la double couche lipidique.

La traversée de la membrane cytoplasmique peut se faire par simple diffusion passive ou "emprunter" un système de transport bactérien consommant de l'énergie (transport actif). Les aminosides utilisent cette dernière technique en se fixant à une protéine associée à une chaîne transporteur d'électron naturellement absente chez les bactéries anaérobies, qui sont toutes résistantes aux aminosides. C'est sans doute par un mécanisme comparable que l'on peut expliquer la résistance des streptocoques - donc du pneumocoque - aux aminosides. (Euzeby, 2005 b)

Qu'il ne soit ni modifié ni détruit

De nombreuses enzymes codées par le chromosome bactérien ou par des plasmides sont capables de détruire ou de modifier la molécule de façon telle que la fixation à la cible est rendue impossible.

Une fois de plus, les bactéries à Gram négatif sont avantagées car la membrane extérieure délimite un espace périplasmique où pourront s'accumuler certaines de ces enzymes. (Euzeby, 2005 b)

Qu'il se fixe à une cible

Les cibles principales que peuvent atteindre les antibiotiques sont:

- Les membranes : extérieure et cytoplasmique,
- La voie de synthèse du mucopeptide de la paroi,
- La voie de synthèse des protéines,
- La voie de synthèse des acides nucléiques.

Souvent, l'effet des antibiotiques ne dépend pas que de la fixation à une cible unique. Les bêta-lactamines sont des antibiotiques bactériostatiques : l'effet bactéricide que l'on observe tient à l'activation excessive d'un système autolytique normal. On assiste donc à une fixation puis destruction de la cible. (Euzeby, 2005 b)

1.1.3.2 Mécanismes De Résistances Des Bactéries

Pour qu'une bactérie résiste à un antibiotique, il faut qu'elle s'oppose à ses actions:

Si l'antibiotique doit :

- traverser la paroi
- ne pas être modifié ni détruit
- se fixer à une cible

La bactérie peut :

- devenir imperméable ou s'opposer à son transport,
- synthétiser des enzymes qui le modifient ou l'hydrolysent,
- protéger la cible.

(Euzeby, 2005 b)

L'imperméabilisation

Elle concerne la membrane extérieure (pour les bactéries à Gram négatif) ou la membrane cytoplasmique (pour toutes les bactéries).

C'est le mécanisme le plus souvent responsable de la résistance naturelle (qui est un caractère propre à l'espèce). Il peut concerner: les bêta-lactamines, les cyclines, les phénicolés et les macrolides.

On peut rencontrer ce mécanisme dans la résistance mutationnelle (bêta-lactamines, quinolones, aminosides, phénicolés) ou dans la résistance plasmidique (tétracycline). (Euzeby, 2005 b)

L'inactivation

C'est le mécanisme le plus souvent responsable de la résistance plasmidique. Il concerne particulièrement :

- Les bêta-lactamines : pénicillinases, céphalosporinases hydrolysant la molécule.
- Les aminosides : transférases qui phosphorylent, acétylent ou adénylent certains sites de la molécule.
- Les phénicolés : transférase qui acétyle la molécule.

On peut rencontrer ce mécanisme dans la résistance mutationnelle : certaines bactéries synthétisent des faibles quantités de bêta-lactamases (ce qui suggère une fonction physiologique de ces enzymes dans la vie de la cellule). Une mutation altère le gène de régulation et provoque une synthèse accrue (bêta-lactamase "déréprimée"). (Courvalin et Trieu-Cuot, 1989 ; Euzeby, 2005 b)

Modification de la cible

C'est le mécanisme le plus souvent responsable de la résistance mutationnelle. La cible est légèrement modifiée par la substitution d'un acide aminé dans la protéine (s'il s'agit d'une enzyme ou d'une protéine ribosomale) ou la substitution d'un nucléotide (s'il s'agit de l'ARN ribosomal).

Il peut concerner : les bêta-lactamines, les aminosides, les macrolides et les quinolones.

On peut rencontrer ce mécanisme dans la résistance plasmidique : dans le cas des macrolides, une méthylase modifie deux nucléotides du ribosome qui perd son affinité pour l'antibiotique. (Euzeby, 2005 b)

1.1.3.3 Le support génétique de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un caractère de la bactérie qui, en tant que tel, s'exprime par la synthèse de protéines.

Dans la *résistance naturelle*, les protéines codées par le chromosome ont une structure telle qu'elles empêchent la pénétration de l'antibiotique (les membranes sont imperméables, un système de transport est absent) ou l'inactivent (les bêta-lactamases chromosomiques).

Dans la *résistance mutationnelle*, une altération du chromosome se traduit par la synthèse de protéines modifiées : les membranes deviennent imperméables, un système de transport n'accepte plus l'antibiotique, la cible (enzyme ou ribosome) ne fixe plus l'antibiotique, un répresseur ne contrôle plus certains gènes (dérépression des bêta-lactamases). (Euzeby, 2005 b)

Dans la *résistance plasmidique*, l'acquisition d'une information génétique supplémentaire permet la synthèse de protéines additionnelles dont la présence modifie les membranes ou dont l'activité enzymatique se révèle capable de modifier la cible ou d'inactiver l'antibiotique. (Courvalin et Trieu-Cuot, 1989 ; Birge, 1994)

Cette classification traditionnelle ainsi proposée montre qu'en fait les mécanismes de résistance sont identiques. Le plasmide, élément génétique autonome peut aussi, comme le chromosome, subir des mutations. Ainsi sont apparues des bêta-lactamines inactivées après modification par certaines bêta-lactamases. (Euzeby, 2005 b)

Le dénominateur commun est représenté par la transposition : Il existe des gènes dont l'unique vocation est le déplacement ; ils ne codent que pour une enzyme qui leur est spécifique, *la transposase*, qui assure leur migration. Certains éléments transposables sont dupliqués lorsqu'ils se déplacent. Le déplacement peut se faire sur le chromosome, entre chromosome et plasmide, entre plasmides. (Courvalin et Trieu-Cuot, 1989 ; Euzeby, 2005 b)

Un gène de résistance encadré par deux éléments transposables devient un "module" capable de déplacement et de multiplication. La frontière entre résistance chromosomique et résistance plasmidique devient dès lors plutôt floue. (Pelmon, 1995 a ; Euzeby, 2005 b)

La figure 9 commente les mécanismes de résistance d'une bactérie aux antibiotiques en général (et aux quinolones en particulier qui se fait par mutations et par efflux actif aussi bien pour la fluméquine que pour l'enrofloxacin) :

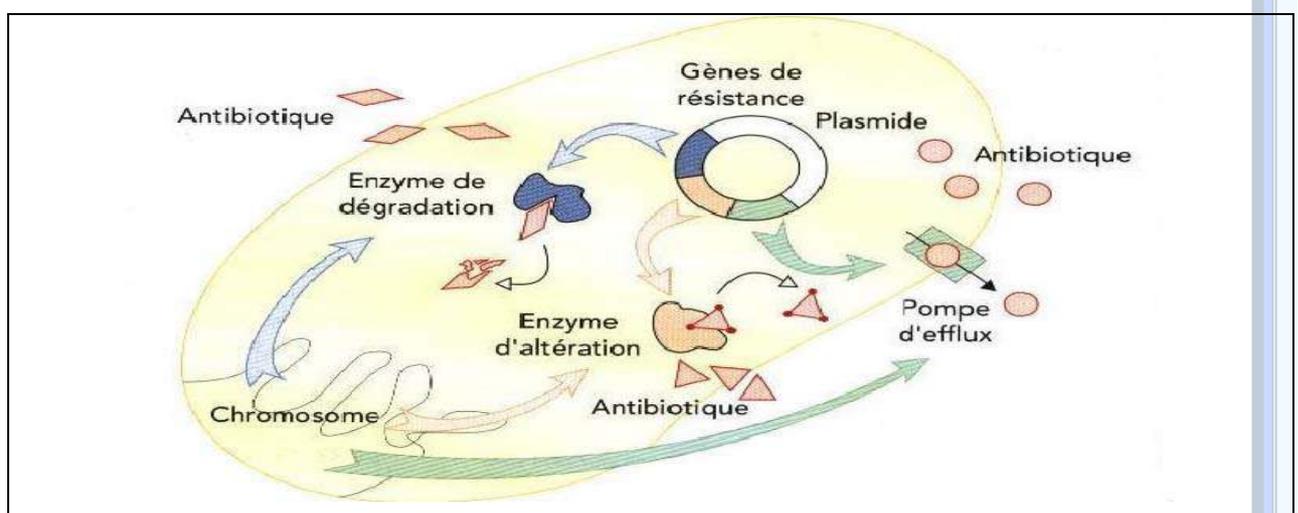


Figure 9 : Mécanismes de résistance d'une bactérie aux antibiotiques. (Meunier *et al.*, 2002)

Certains gènes de résistance aux antibiotiques codent pour :

- Des pompes d'efflux (en vert) ;
- Des enzymes de dégradation (en bleu) ;
- Des enzymes d'altération (en beige).

L'antibiotique est donc :

- Expulsé à l'extérieur de la bactérie (ronds rouges) ;
- Dégradé par une enzyme (losanges rouges) ;
- Altéré par une enzyme (triangles rouges).

Ces gènes de résistance sont situés sur le chromosome bactérien ou sur le plasmide. (Meunier *et al.*, 2002)

1.2 LES ENTEROBACTERIES

Traditionnellement, la définition de la famille des *Enterobacteriaceae* est la suivante : bacilles droits à Gram négatif, non acido-résistants, de 0,3 à 1,0 *mm* de diamètre sur 1,0 à 6,0 *mm* de longueur, non sporulés, parfois capsulés, possédant une ciliature péritriche pour les espèces mobiles, aéro-anaérobies, possédant à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose (avec ou sans production de gaz), catalase positive, oxydase négative, nitrate réductase positive, capables de croître sur des milieux ordinaires à base de peptone ou d'extraits de viande, non halophiles, possédant l'antigène de Kunin (également appelé E.C.A. pour Enterobacterial Common Antigen). (Pilet *et al.*, 1979 ; Freney *et al.*, 2000 ; Euzeby, 2005a)

1.2.1. CARACTERES GENERAUX

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante :

- Bacilles à Gram négatif,
- Aéro-anaérobies,
- Mobiles ou immobiles,
- Facilement cultivables,
- Fermentant le glucose,
- Réduisant les nitrates en nitrites,
- Dépourvus d'oxydase. (Pilet *et al.*, 1979 ; Eberlin, 1997 ; Euzeby, 2005 a)

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend 130 espèces actuellement répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux 14 genres définis par la nouvelle classification de Holt, 1984 : *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* et *Yersinia*. La majorité de ces genres sont importants dans la microbiologie aviaire, et sont potentiellement pathogènes pour l'homme. (Pilet *et al.*, 1979 ; Fung, 1987 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Euzéby, 2005a)

1.2.1.1 Morphologie et structure

Ce sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 3 micromètres de long sur 0,6 de large.

Les *Proteus* sont très polymorphes : formes longues et filamenteuses ou petits bacilles droits (Protée est un dieu de la mythologie grecque qui changeait de forme à volonté).

Les espèces mobiles - les plus nombreuses - le sont grâce à une ciliature péritriche.

Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*).

Les *Klebsiella* sont capsulées. (Pilet *et al.*, 1979 ; Euzéby, 2005 a)

La plupart des espèces pathogènes possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion. (Euzéby, 2004)

Les entérobactéries possèdent une paroi dont la structure en trois couches est particulière à ces bactéries. Cette paroi est constituée de l'extérieur vers l'intérieur : d'une membrane externe, d'une couche mince de peptidoglycane et d'un espace périplasmique qui entoure la membrane cytoplasmique. (Leminor *et al.*, 1989 ; Euzéby, 2004 ; Euzéby, 2005 a)

La membrane externe protège les entérobactéries de l'action des sels biliaires et des ferments digestifs. Elle est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle sont incluses des molécules de lipopolysaccharide (LPS) qui comprend 3 parties :

- Le lipide A qui est l'endotoxine ;
- Le core central, polysaccharide de base (constituant l'antigène R) ;
- Les polysides des chaînes latérales (constituant les antigènes O). (Pilet *et al.*, 1979 ; Spicer, 1992 ; Euzéby, 2004)

S'y trouvent aussi des protéines diverses dont les porines (Omp pour Outer membrane protein) qui, en se polymérisant, forment des canaux assurant le passage des molécules hydrophiles à travers cette membrane externe par ailleurs très hydrophobe. (Leminor *et al.*, 1989 ; Euzéby, 2005 a)

Le peptidoglycane constitue une couche rigide, plus mince et plus lâche que chez les bactéries à Gram positif. Il est composé de chaînes linéaires de polyosides reliées entre elles par des peptides. L'assemblage et le remodelage du peptidoglycane sont sous la dépendance de transpeptidases et de carboxypeptidases qui fixent les bêta-lactamines et sont pour cette raison dénommées PBP (pour Penicillin binding proteins) ou PLP (pour Protéines de liaison aux pénicillines). (Leminor *et al.*, 1989)

Dans l'espace périplasmique s'accumulent des enzymes qui dégradent les substances prélevées dans le milieu extérieur et nécessaires au métabolisme de la bactérie. On y trouve également les bêtalactamases capables d'hydrolyser les bêta-lactamines. (Euzeby, 2005 a)

La membrane cytoplasmique est constituée, comme toutes les membranes cellulaires, d'une double couche phospholipidique hydrophobe dont la perméabilité est rendue sélective par la présence de protéines dénommées perméases. De nombreuses enzymes et notamment celles qui interviennent dans le métabolisme énergétique sont insérées dans cette membrane. S'y trouvent aussi, sur sa face externe, les transpeptidases et carboxypeptidases nécessaires à la synthèse du peptidoglycane. (Leminor *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2005 a)

1.2.1.2 Culture

Les entérobactéries se développent rapidement *in vitro* sur des milieux "ordinaires". La température optimale de croissance est 37°C mais la culture est possible entre 20° et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes. (Leminor *et al.*, 1989 ; Singleton, 1994 a)

Sur gélose, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges, grasses et luisantes. (Pilet *et al.*, 1979 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2005 a)

L'examen des cultures sur milieux ordinaires ne permet pas, le plus souvent, de distinguer une entérobactérie d'une autre, c'est pourquoi, d'autres milieux de culture plus sélectifs s'imposent. (Pilet *et al.*, 1979 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Freney *et al.*, 2000)

En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon. (Pilet *et al.*, 1979 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2005 a)

1.2.1.3 Caractères biochimiques

Les propriétés qui définissent la famille doivent être mises en évidence pour affirmer que la souche est une entérobactérie.

Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane,...) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose,...), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases,...), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz. (Pilet *et al.*, 1979 ; Lemnor *et al.*, 1989 ; Singleton, 1994 b ; Euzeby, 2005 a)

Le tableau 1 résume les caractères d'identification biochimiques des genres les plus fréquemment rencontrés :

Tableau 1: Caractères biochimiques des Entérobactéries.

(Pilet *et al.*, 1979 ; Lemnor *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2004)

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
Acétoine (VP)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H ₂ S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

N.B. : (*) à 20°C seulement.

1.2.1.4 Caractères antigéniques

Les entérobactéries possèdent différents antigènes :

Un antigène commun dénommé E.C.A. (pour Enterobacterial Common Antigen) ou antigène de Kunin. Cet antigène n'existe que chez les entérobactéries et, de ce fait, a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries. (Euzeby, 2005 a)

Les antigènes O ou somatiques, correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS). Ils sont thermostables et résistent à l'alcool. Les bactéries portant des antigènes O sont agglutinées par les anticorps correspondants ; les agglutinats sont fins, lents à se constituer et difficilement dissociables par agitation (agglutination "corps à corps"). (Pilet *et al.*, 1979 ; Lemnor *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2005 a)

L'antigène R (modification de O) correspond au polysaccharide du core central. La disparition de l'antigène O le démasque et rend les souches "rough" (colonies rugueuses) autoagglutinables dans l'eau physiologique, plus sensibles aux substances bactéricides du sérum, plus facilement phagocytées et donc moins pathogènes. (Pilet *et al.*, 1979 ; Euzeby, 2005 a)

Les antigènes H ou flagellaires n'existent que chez les souches mobiles. Constitués de protéines spécifiques dénommées flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Ils provoquent une agglutination floconneuse (accolement des bactéries par leurs flagelles), rapidement constituée mais facilement dissociable par agitation (rupture des flagelles). (Pilet *et al.*, 1979 ; Lemnir *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2005 a)

Les antigènes de surface comprenant:

- Les **antigènes K, capsulaires**, de nature polysaccharidique. Chez les *Escherichia coli*, les *Shigella* ou chez certaines *Salmonella* et *Citrobacter* (alors appelés Vi), ils masquent l'agglutination par les anticorps anti O qui peut être restituée après chauffage de la souche car ils sont détruits par ébullition. (Pilet *et al.*, 1979)
- Les **antigènes d'adhérence ou adhésines** de nature protéique, portés par des pili communs (encore appelés fimbriae). (Lemnir *et al.*, 1989 ; Freney *et al.*, 2000 ; Euzeby, 2005 a)

Notion de Pili et fimbriae

La microscopie électronique a révélé la présence de structures filiformes, différentes des flagelles, non impliquées dans la mobilité et appelées pili ou fimbriae. Il existe une certaine confusion dans la nomenclature de ces appendices et on peut parler de pili pour désigner les appendices qui jouent un rôle dans la conjugaison (pili sexuels ou pili F) et de fimbriae pour désigner les appendices impliqués dans des phénomènes d'adhésion. Le terme d'adhésine est beaucoup plus général puisqu'il recouvre les fimbriae mais aussi de nombreuses autres molécules (notamment des protéines) jouant un rôle dans l'attachement des bactéries aux cellules eucaryotes. (Pilet *et al.*, 1979 ; Euzeby, 2005 a)

Les fimbriae peuvent avoir deux aspects. Ce sont soit des bâtonnets rigides de 5 à 7 nm de diamètre soit des filaments flexibles de 2 à 3 nm de diamètre. Ces fimbriae semblent être présents chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et ils semblent plus rares chez les bactéries à Gram positif. (Freney *et al.*, 2000 ; Euzeby, 2005 a)

1.2.2 ENTEROBACTERIES ET ANTIBIOTIQUES

Les entérobactéries opposent une résistance naturelle aux Pénicillines G et M, aux macrolides et à la vancomycine.

Certaines d'entre elles sont naturellement résistantes à d'autres molécules : les *Proteus* et *Serratia* à la colistine, les *Klebsiella* et *Levinea* à l'ampicilline. Ces résistances étant naturelles définissent des phénotypes dits "sensibles" ou "sauvages". (Euzeby, 2005 a ; Euzeby, 2005 b)

1.2.2.1 Résistances naturelles

Résistance aux bêtalactamines

En testant quatre molécules : pénicilline A, carboxypénicilline, céphalosporine de 1^{ère} génération (ou C1G) et céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G), on peut définir 4 types de comportement des entérobactéries vis à vis des bêta-lactamines. (Berche *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2005 b)

Tableau 2 : Différents types de comportement des entérobactéries vis à vis des bêtalactamines. (Euzeby, 2005 b)

Groupe	Peni A	Carb	C1G	C3G	Types de comportement des entérobactéries	
1	S	S	S	S	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> .	Phénotypes sensibles
2	R	R	S	S	<i>Klebsiella</i> , <i>Levinea</i>	Pénicillinase chromosomique
3	R	S	R	S	<i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus indole</i> +, <i>Serratia</i> , <i>Providencia</i> .	Céphalosporinase
4	R	R	R	S	<i>Yersinia enterocolitica</i> .	Pénicillinase + Céphalosporinase

Résistance aux autres antibiotiques

Les aminosides, quinolones et phénicolés sont normalement actifs contre les entérobactéries mais les résistances acquises sont fréquentes. (Courvalin et Philippon, 1989 ; Euzeby, 2005 b)

1.2.2.2 Résistances acquises

Par production d'enzymes

Résistance aux bêtalactamines

C'est surtout en produisant des bêtalactamases que les entérobactéries acquièrent des résistances aux bêta-lactamines. (Courvalin et Philippon, 1989)

Les pénicillinases (TEM), d'origine plasmidique, rendent les souches qui en produisent résistantes aux péni G, A et aux carbénicillines mais si le niveau de production est élevé, la résistance s'étend aux céphalosporines de première et seconde génération (C1G, C2G) et à quelques C3G. (Berche *et al.*, 1989 ; Euzeby, 2005 b)

Certaines de ces pénicillinases résistent aux inhibiteurs qui sont alors totalement inopérants : on les appelle TRI (pour TEM résistantes aux inhibiteurs) et les souches productrices sont résistantes aux pénicillines A et aux carboxypénicillines même lorsqu'elles sont associées à ces inhibiteurs. (Euzeby, 2005 b)

La production importante de céphalosporinase (céphalosporinase "déréprimée"), d'origine chromosomique, rend les souches résistantes à toutes les bêtalactamines sauf aux carbapénems.

Depuis peu sont apparues, chez *Klebsiella pneumoniae* surtout, des bêtalactamases à spectre étendu d'origine plasmidique qui inactivent toutes les bêta-lactamines, sauf certaines C2G et les carbapénems. (Courvalin et Philippon, 1989 ; Euzeby, 2005 b)

- Les entérobactéries du groupe 1 et *Escherichia coli* en particulier expriment parfois une pénicillinase sensible aux inhibiteurs (50% des colibacilles). Il arrive que cette pénicillinase soit abondamment produite (pénicillinase de haut niveau) et dans ce cas les inhibiteurs se révèlent moins efficaces.

Une pénicillinase TRI est présente chez 3% environ des souches d' *Escherichia coli*.

- Les entérobactéries du groupe 2 (*Klebsiella, Levinea*) produisent parfois leur pénicillinase naturelle à un haut niveau.

- Les entérobactéries du groupe 3 (*Enterobacter, Citrobacter, Proteus, Providencia, Serratia*) produisent naturellement une céphalosporinase qui peut être déréprimée. (Euzeby, 2005 b)

Résistance aux aminosides

Les enzymes qui hydrolysent les aminosides sont :

- Les aminosides phosphotransférases (APH) ;
- Les aminosides nucléotidyltransférases (ANT) ;
- Les aminosides acétyltransférases (AAC).

On peut, en testant les quatre aminosides les plus fréquemment utilisés (gentamicine, tobramicine, nétilmicine et amikacine), définir les phénotypes suivants : G, GT, GTN, TNA et GTNA. (Berche *et al.*, 1989 ; Courvalin et Philippon, 1989)

Ces résistances sont parfois difficiles à déceler et il faut une observation attentive et une interprétation correcte des résultats des antibiogrammes. (Berche *et al.*, 1989 b)

Les phénotypes résistants sont rares : moins de 3% chez *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Shigella*, un peu moins rares chez les *Proteus* mais deviennent plus fréquents, atteignant 20 à 50%, chez les autres entérobactéries : *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*. (Euzeby, 2005 b)

Résistance aux phénicolés

Une chloramphénicol-acétyl-tranférase (CAT) est responsable de la résistance des entérobactéries aux phénicolés en particulier de certaines souches de *Salmonella*. (Courvalin et Philippon, 1989)

Par d'autres mécanismes

Imperméabilité ou *modification des cibles* sont plus rarement la cause de résistance chez les entérobactéries :

Une mutation portant sur les porines est cause de résistance à haut niveau chez les *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus* et rarement *Salmonella*.

Les mutations qui affectent le transport actif des aminosides sont également responsables d'une résistance croisée à ces antibiotiques. (Courvalin et Philippon, 1989)

Une mutation affectant l'ADN gyrase détermine une résistance aux quinolones (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Providencia*).

Les mutations qui affectent les protéines ribosomales, entraînent une diminution de l'affinité des ribosomes pour les aminosides. De tels mutants sont rarement isolés en clinique. (Euzeby, 2005 b)

1.3 *ESCHERICHIA COLI*

1.3.1. DEFINITION

Escherichia coli est l'organisme vivant qui a fait l'objet d'un grand nombre d'études. Ce procaryote n'est autre qu'une bactérie que l'on retrouve dans le tube digestif de l'homme et des autres mammifères. L'environnement étant en évolution permanente, il engendre chez cette bactérie ainsi que d'autres la particularité de s'adapter ; mais cela ne change en rien sa structure de base. C'est une cellule qui fait $0.5 \mu\text{m}$ de large sur $1.5 \mu\text{m}$ de long et qui porte de nombreuses fibres de nature protéique à sa surface : les flagelles (responsables de la motilité de la cellule et atteignant $10 \mu\text{m}$ de long) et les pili (plus court et permettant la fixation de la cellule aux surfaces). Elle est recouverte d'une couche de peptidoglycane qui forme la paroi bactérienne lui conférant une résistance mécanique assurant ainsi sa protection. La membrane plasmique qui vient sous la paroi est constituée de deux couches de lipides truffées de protéines qui confèrent une perméabilité élective par le va-et-vient de certaines molécules et ions entre le cytoplasme et le milieu. Le cytoplasme est une substance dense à sa périphérie et dans laquelle baignent des ribosomes, et fluide en son centre (c'est le cytosol qui renferme le matériel génétique de la bactérie = le nucléotide). Le matériel génétique de *Escherichia coli* est une grande molécule d'ADN circulaire comportant environ 2000 gènes et localisée dans la région du nucléotide. (Horton *et al.*, 1994)

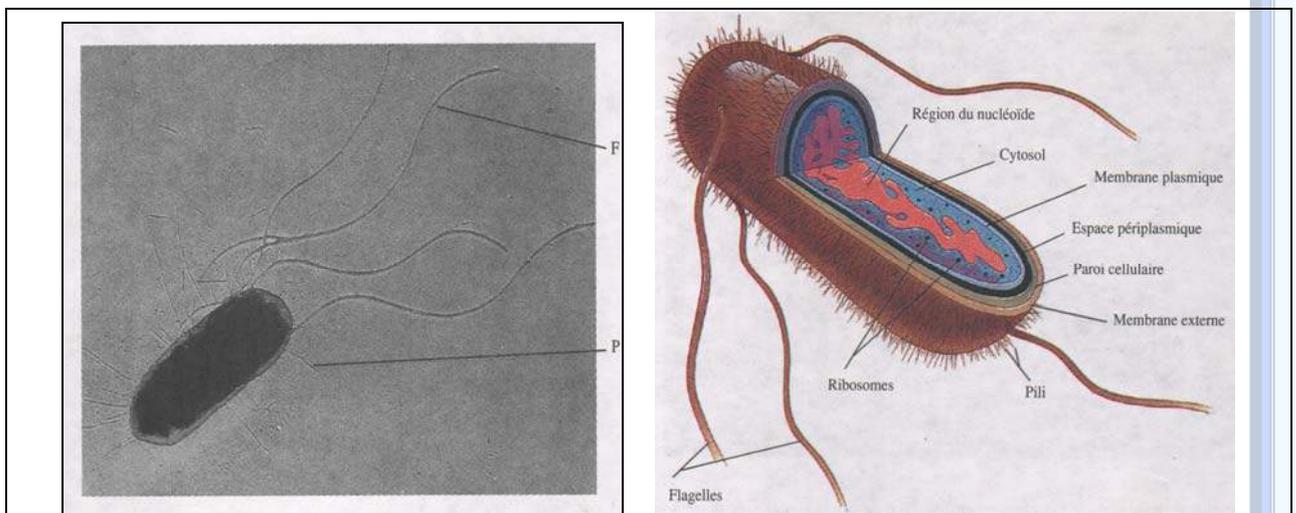


Figure 10 : *Escherichia coli*. (Horton *et al.*, 1994)

(à gauche : Micrographie électronique d'une cellule d'*E. coli*, avec ses flagelles (F) et ses pili (P) ; à droite : Ultrastructure de la bactérie *Escherichia coli*)

1.3.2. CARACTERISTIQUES

Bactérie isolée en 1885 par Théodor von Escherich et couramment appelée "colibacille".

1.3.2.1 Habitat

Hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. *E. coli* ou colibacille est habituellement une bactérie commensale, elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers. Les *E. coli* n'existent pas normalement dans l'eau et le sol, leur présence est un témoin de contamination fécale. (Pilet *et al.*, 1979 ; Nauciel, 2000)

1.3.2.2 Bactériologie

Les *Escherichia coli* interviennent chez l'homme et diverses espèces animales (bovins, cheval, porc et volailles). Chez la volaille, il est responsable d'une maladie respiratoire chronique, d'une coligranulomatose et autres entités cliniques. (Gordon, 1979 ; Lecoanet, 1992 ; Villate, 2001 a)

E.coli exprime les caractères généraux (morphologiques, culturels et biochimiques) des entérobactéries. C'est un bacille à Gram négatif, de 0.5 μ m de large sur 1.5 μ m de long, polymorphe, mobiles. Il pousse sur milieux ordinaires en 24 heures à 37°C, à pH voisin de la neutralité ; sur gélose, on observe des colonies S (smooth), lisses, de 1.5 à 3mm de diamètre, arrondies, limitées par un bord régulier, de surface lisse, translucides, plates à centre ombiliquée. On observe également des colonies R (rough), rugueuses, à bord finement dentelé correspondant généralement à de vieilles souches. En bouillon, on constate un trouble homogène avec parfois une collerette. Il est en outre: lactose +, indole +, acétoïne (Vosges-Proskauer) -, citrate -, H₂S -, gaz +, uréase -. (Pilet *et al.*, 1979 ; Berche *et al.*, 1989 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Koch, 1995)

1.3.2.3 Antigènes

La structure antigénique des colibacilles est complexe : ces bactéries comportent des antigènes majeurs O, K, H et des antigènes mineurs R, M... On retiendra dans cette étude que les antigènes majeurs :

Les antigènes somatiques O : ils comprennent 180 types antigéniques détectables par agglutination.

Les antigènes flagellaires H : au nombre de 56, ils sont difficiles à mettre en évidence.

Les antigènes capsulaires ou d'enveloppe K : On distingue actuellement 99 antigènes K de structure polysaccharidique : les souches les plus pathogènes possèdent l'antigène K1. L'ancienne distinction de ces antigènes en types L, A et B est abandonnée. (Pilet *et al.*, 1979 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Lecoanet, 1992)

1.3.3. FACTEURS DE PATHOGENICITE

L'étude des facteurs de pathogénicité des colibacilles a montré que dans l'espèce, il existe de nombreux variants exprimant des potentialités pathogènes diverses : les pathovars.

Les facteurs de pathogénicité sont :

- Une **capsule** qui s'oppose à la phagocytose. Ce sont les *E. coli* de type K1 qui sont pathogènes.
 - 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, au détriment de la transferrine.
 - Des **adhésines** : conférant aux souches qui les possèdent la propriété de se fixer aux cellules épithéliales. De nature protéique, elles sont portées le plus souvent par les **pili** communs. L'adhérence constitue une étape essentielle de la pathogenèse des infections dues aux bactéries entériques. (Pilet *et al.*, 1979 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Nauciel, 2000 ; Villate, 2001 a ; Mellata *et al.*, 2003)
 - Des **toxines** : certaines souches peuvent produire :
 - L'**endotoxine**, commune aux entérobactéries,
 - Les **entérotoxines** ST (thermostables) et LT (thermolabiles). Ce sont des toxines cytotoxiques qui agissent sur le contrôle entérocytaire de la sécrétion hydro-électrolytique. La toxine LT est proche de la toxine cholérique.
 - Les **cytotoxines** SLT1 et SLT2 (**Shiga-like toxin**). Ce sont des toxines qui altèrent l'intégrité des entérocytes. On les appelle encore des vero-toxines (VT) à cause de leur effet toxique sur les cellules vero en culture (cellules d'un singe africain).
- (Pilet *et al.*, 1979 ; Leminor *et al.*, 1989 ; Pelmon, 1995 (b) ; Nauciel, 2000 ; Villate, 2001 a ; Caprioli A. *et al.*, 2005)

1.3.4. POUVOIR PATHOGENE

1.3.4.1 Infections de l'appareil urinaire

Il est connu que les infections urinaires à colibacille sont dues à la migration de ces germes du tube digestif vers l'arbre urinaire par voie ascendante et externe. Des raisons anatomiques expliquent leur plus grande fréquence pour l'appareil urinaire.

Cependant, la contamination par le colibacille ne donne une infection urinaire et surtout une atteinte du parenchyme rénal, qu'avec certaines souches particulières capables d'adhérer aux cellules de l'arbre urinaire.

Les souches uro-pathogènes appartiennent plus fréquemment aux sérotypes O 1, 2, 4, 6, 7, 16, 18, 75 et K 1, 2, 3, 12, 13 qui possèdent des adhésines.

(Curtis *et al*, 1981 ; Leminor *et al*, 1989 ; Nauciel, 2000 ; Mokady *et al.*, 2005)

1.3.4.2 Infections abdominales

E. coli est souvent responsable des infections péritonéale, hépatique, ou génitale. Les souches en cause ont un pouvoir cytotoxique sur les polynucléaires, opposent une résistance à la phagocytose et possèdent des systèmes de captation du fer ; c'est le cas du sérotype **O78:K80** responsable de lésions hépatiques et intestinale. (Dominick *et al*, 1984 ; Leminor *et al*, 1989)

1.3.4.3 Bactériémies

Les pathovars incriminés dans les bactériémies, voire septicémie sont caractérisés par un fort pouvoir invasif. Ils possèdent des systèmes de captation du fer, des cytotoxines qui, occasionnant des dégâts tissulaires, facilitent leur diffusion et des facteurs de résistance à la phagocytose (par la capsule) et à l'action bactéricide du complément (par les chaînes latérales du LPS). Les sérotypes O1:K1, O2:K1 et **O78:K80** sont responsable de septicémie. (Arp, 1982 ; Barbour *et al*, 1985 ; Leminor *et al*, 1989 ; Mokady *et al.*, 2005)

1.3.4.4 Le choc endotoxinique

Chez l'homme, Fièvre, collapsus et hémorragies sont les symptômes principaux du redoutable choc septique qu'engendre la lyse massive dans l'organisme d'entérobactéries (ou de bactéries à Gram négatif) qui libèrent de grandes quantités de LPS. C'est le Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (S.R.I.S.).

Chez la volaille, une endotoxine isolée à partir d'une souche pathogène d'*Escherichia coli* (**O78**) est responsable d'une atteinte hépatique et rénale. (Curtis *et al*, 1981 ; Leminor *et al*, 1989)

1.3.4.5 Syndromes diarrhéiques

Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont en cause selon les souches responsables :

Souches entérotoxigènes: ETEC (Enterotoxinogen Escherichia coli)

(O6, O8, O15, O18, O20, O25, O26, O27, O44, O55, O63, **O78**, O80, O85, O86, O111, O114, O115, O119, O125, O126, O127, O128, O139, O142, O146, O148, O154, O155 et O156)

Ces souches sont responsables chez l'homme, les bovins, le porc et la volaille, d'un syndrome diarrhéique épidémique. 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. (Sekizaki *et al.*, 1985 ; Acha et Szyfres, 1989 ; Hee Kon Jung, 1999 ; Sandor *et al*, 1992 ; Haslay *et al*, 1993 ; Moalic *et al*, 2000)

Souches entéroinvasives : EIEC (Enteroinvasive Escherichia coli)

(O28, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152)

Ces souches (très voisines des shigelles par leurs caractères biochimiques et antigéniques) sont responsables de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale. Cette pathologie ressemble à celle causée par les shigelles. (Acha et Szyfres, 1989 ; Sandor *et al*, 1992 ; Haslay *et al*, 1993 ; Moalic *et al*, 2000)

Souches entérohémorragiques : EHEC (Enterohaemorrhagic Escherichia coli)

(O157 mais aussi O26 et O111)

Ces souches sont responsables de diarrhées sanglantes et de colites hémorragiques liées à la production de toxines SLT. Le syndrome hémolytique et urémique seraient dus aux lésions que produisent ces toxines sur les endothéliums des capillaires. (Sandor *et al*, 1992 ; Haslay *et al*, 1993 ; Moalic *et al*, 2000 ; Szalo *et al.*, 2002 ; Caprioli A. *et al.*, 2005)

Souches entéropathogènes : EPEC (Enteropathogen Escherichia coli)

(O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 et O158)

Ces souches sont responsables de gastro-entérites, selon un mécanisme physiopathologique imparfaitement élucidé. Ces souches adhèrent à la surface des entérocytes sans les envahir. Elles sont proches des souches entérohémorragiques (EHEC) car elles produisent les toxines SLT qui seraient responsable des lésions. (Sandor *et al*, 1992 ; Haslay *et al*, 1993)

Si les EPEC ne produisent pas de toxine du type LT ou ST, ils produisent une autre toxine active sur les cellules véro et, c'est pour cette raison qu'ils sont également appelés (*Véro Toxinogen Escherichia coli*). (Leminor *et al*, 1989 ; Moalic *et al*, 2000 ; Caprioli A. *et al.*, 2005)

Un sérotype particulier : *E. coli* O157:H7, fréquemment producteur de verotoxines (VT) est responsable chez l'homme du Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) avec parfois, des Purpuras Thrombocytopéniques Thrombotiques (TTP). (Vernozy-Rozand *et al*, 1997 ; Magras *et al*, 1998)

1.4. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A COLIBACILLES

Il repose sur l'isolement de la bactérie au site de l'infection. A partir de prélèvements divers : urines, selles, sang, LCR, pus, liquide d'ascite, organes (foie, cœur, rate, moelle), on recherche le colibacille par des techniques bactériologiques :

➤ **L'examen microscopique** révèle la présence de bacilles à Gram négatif mais il arrive que la morphologie soit atypique.

➤ **La culture** sur milieux simples ou sur milieux lactosés avec indicateur coloré donne lieu au développement de bacilles à Gram négatif, fermentant le lactose et possédant les caractères biochimiques qui caractérisent l'espèce (cf. *tableau 1* sur les caractères d'identification biochimiques). Du fait de leur commodité et fiabilité, les mini-galeries de type API-bioMérieux sont les plus employées au niveau des laboratoires ; mais pour les souches les plus répandues comme *Escherichia coli*, on peut éviter d'ensemencer des galeries complètes.

➤ **Un sérotypage** n'est pratiqué couramment que pour les souches entéropathogènes (EPEC) et pour les sérotypes O157 (EHEC) et **O78** (ETEC) pour lesquelles il existe des sérums agglutinants spécifiques.

➤ **La mise en évidence des entérotoxines** n'est pas facile. Les méthodes de détection par techniques immunologiques, par l'étude de l'effet cytopathogène sur des cultures cellulaires ou par hybridation ADN/ADN ne sont pas couramment pratiquées mais on peut penser que des tests simples et spécifiques seront mis au point dans un proche avenir.

➤ **La recherche de l'antigène K1** dans le sérum, le LCR ou les urines du sujet atteint, par agglutination de particules de latex sensibilisées, permet un diagnostic rapide mais on observe une réaction croisée avec l'antigène du groupe B des méningocoques.

➤ **Le sérodiagnostic** des infections à colibacilles n'est utile que dans les infections urinaires où la découverte d'anticorps (par agglutination ou par hémagglutination passive) fait craindre une "infection haute" chez l'homme.

On peut révéler la présence d'adhésines grâce à leur pouvoir hémagglutinant sur les globules rouges humains ou animaux. (Euzéby, 2005 b)

Les souches EIEC qui ressemblent aux *Shigella* sont reconnues par leur pouvoir invasif mis en évidence par le test de Sereny (l'instillation de la souche dans l'oeil d'un cobaye provoque une kérato-conjonctivite) ou par leur pouvoir envahissant sur cellule HeLa en culture.

Il est parfois demandé de rechercher sur les souches isolées d'infections urinaires des anticorps fixés sur les bactéries dont la présence signerait une infection haute, rénale ou pyélocalicelle. (Eberlin, 1997 ; Nauciel, 2000)

1.5. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Escherichia coli est généralement sensible aux antibiotiques. (Adesiyun and Kaminjolo, 1992)

Parmi les bêta-lactamines, sont actives les pénicillines du groupe A (aminopénicillines), les carboxypénicillines, les céphalosporines, les acyluréido-pénicillines, les carbapénems et les monobactams.

Les aminosides et les polypeptides sont également actifs, de même que les quinolones de première génération et les fluoroquinolones.

Cependant, beaucoup de souches d'*E. coli* ont acquis des résistances et leur sensibilité aux antibiotiques se trouve modifiée par la production d'enzymes hydrolysant les bêta-lactamines (pénicillinase, céphalosporinase) ou les aminosides ou par une mutation affectant les porines (disparition de l'Omp F). L'antibiogramme est donc généralement nécessaire au choix du traitement.

(Euzéby, 2005 b)

2. APPROCHE CLINIQUE SUR LES *ESCHERICHIA COLI* OU LES COLIBACILLOSES CHEZ LE POULET DE CHAIR

2.1 INTRODUCTION

Escherichia coli est responsable de pathologies chez les mammifères, les oiseaux et les reptiles. Les infections à *Escherichia coli* sont considérées comme des maladies infectieuses majeures qui touchent les oiseaux à tout âge. La maladie présente un impact économique important dans la production aviaire. La majorité des pertes économiques résulte des mortalités et d'une diminution de productivité des oiseaux. (Otaki, 1995)

Selon Lecoanet : « Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, *Escherichia coli*, chez les volailles n'est qu'assez peu impliqué en pathologie digestive mais participe à des syndromes variés évoluant sous forme septicémique ou localisée : maladie respiratoire chronique, omphalite, synovite, coligranulomatose, salpingite ». (Lecoanet, 1992)

La maladie colibacillaire est primaire faisant suite à une intervention unique d'une souche très pathogène (expérimentalement) ou secondaire après intervention de plusieurs agents infectieux responsables de signes cliniques : de septicémie colibacillaire, de colibacillose respiratoire ou génitale, d'omphalite, de synovite et d'arthrite qui seront isolés ou plus ou moins mêlés. (Villate, 2001 b)

Chez le poulet de chair, la colibacillose aviaire est fréquemment associée aux souches d'*E. coli* de sérotypes : O1:K1, O2:K1 et **O78:K80**. L'infection survient sous une forme respiratoire aigüe, affectant les sujets âgés de 3 à 10 semaines, et est responsable d'une morbidité et mortalité élevées. La manifestation la plus sévère est représentée par la colisepticémie, caractérisée par une péricardite, une périhépatite, une aérosacculite et une péritonite. (Laragione *et al*, 2000 ; Mellata *et al.*, 2003)

L'ensemble des infections provoquées par *Escherichia coli* est responsable de lourdes pertes économiques surtout lorsqu'il s'agit de colisepticémie dont les lésions entraînent une saisie des carcasses de poulet de chair au niveau des abattoirs. (Yogarathnam, 1995)

2.2 HISTORIQUE

Les premières infections aviaires provoquées par des germes coliformes ont été rapportées par David en 1938 et Twisselman en 1939. Ce n'est que plus tard que le premier *Escherichia coli* fut isolé, à partir d'un sac aérien infecté, selon Wasserman en 1954 et Fahey en 1955. (Gross, 1990)

Des souches pathogènes d'*E. coli* ont fait leur apparition dans les élevages avicoles et furent la cause d'entités pathologiques diverses : la maladie respiratoire chronique (CRD), l'aérosacculite, la péricardite, la péritonite, la salpingite, la synovite, l'ostéomyélite, la panophtalmie, la dermatite nécrosante (cellulite), la mortalité embryonnaire (yolk sac infection), l'omphalite, la colisepticémie et la coligranulomatose (Maladie de HJARRE) engendrant des pertes économiques importantes. (Lecoanet, 1992 ; Villate, 2001 b)

La colibacillose chez les mammifères est presque toujours une entérite primaire alors que la colibacillose aviaire est surtout secondaire. (Barnes *et al*, 1997)

2.3 EPIDEMIOLOGIE

2.3.1 ETIOLOGIE

L'agent causal, *Escherichia coli*, est un bacille à coloration Gram négatif, asporulée, de 2 à 3 μm de long sur 0.6 μm de large, présentant des flagelles qui lui confèrent une mobilité. Selon Siccardi, 1966, la majorité des souches sont mobiles puisque sur 607 souches qu'il a isolées 57% étaient mobiles. (Barnes *et al*, 1997 ; Villate, 2001 b)

Cette bactérie provoque peu de cas d'entérite puisque seulement 10 à 15 % des colibacilles réputés pathogènes sont des hôtes normaux du tube digestif aviaire et surviennent suite à un état de stress ou un affaiblissement de l'organisme ; par contre, 20% des colibacilles qui sont pathogènes le deviennent par le biais de leur structure (plasmide, chromosome) et sont difficilement détectables par la sérotypie.

Les colibacilles possèdent plusieurs types d'antigènes (dont le nombre varie selon les auteurs) : l'antigène somatique (Ag O) connu également sous le nom d'antigène de paroi ou d'endotoxine qui comprend 160 sérotypes O dont 15 recensés chez les volailles; l'antigène capsulaire (Ag K) qui comprend 100 sérotypes K et l'antigène flagellaire (Ag H) qui comprend 60 sérotypes H. La structure antigénique ne renseigne pas sur le pouvoir pathogène ; d'ailleurs, les souches O1, O2 et **O78** réputées pathogènes ne le sont pas toutes ; ce sont plutôt les combinaisons Ag O et Ag K qui donnent les sérotypes O1:K1, O2:K1, **O78:K80** les plus

dangereuses en aviculture. Le pouvoir pathogène est donc lié aux mécanismes d'action de la bactérie, à savoir :

- Une capacité d'adhérence aux muqueuses respiratoires (trachée, pharynx) par des pili codés par un plasmide.
- Une capacité de capter le fer ,soit par la synthèse de sidérophores eux-mêmes codés par un plasmide, soit par un autre système de captation du fer codé par un chromosome.

Les affections colibacillaires aviaires sont inoffensives pour l'homme du fait de l'existence d'une barrière d'espèce. (Villate, 2001 b)

2.3.2 TRANSMISSION

Le tractus intestinal des mammifères et des volailles représente le plus important réservoir d'*Escherichia coli*. Chez les poussins, sur 10^9 CFU (Colonie Formant Unité) par gramme de fèces de germes retrouvés, on compte 10^6 d'*Escherichia coli* dont 10 à 15% sont des souches pathogènes. (Gross, 1990)

La transmission de la maladie se fait essentiellement par la voie aérienne après libération des bactéries (provenant des fientes sèches ou de la litière souillée) dans l'air. Une fois inhalées, les sacs aériens contaminés vont disséminer l'infection par simple contact vers tous les autres organes (ovaire, cavité abdominale, cœur, foie, intestin). La transmission verticale directe (ovaire ou oviducte infecté) est rare ; quant à la forme indirecte (poussin), elle se fait par la contamination en surface des œufs soit lors de leur passage à travers le cloaque ou en tombant sur une litière souillée. Les bactéries sont emprisonnées dans la cuticule pour être ensuite restituées après éclosion sous forme d'aérosols contaminants. (Villate, 2001 b)

Ces souches pathogènes peuvent donc se transmettre par l'œuf, causant de nombreuses mortalités embryonnaires ou mortalités de poussins. Les colibacilles pathogènes sont présents de façon importante dans le tractus intestinale des poussins nouvellement éclos que dans l'œuf desquels ils viennent d'éclore, ce qui laisse supposer que la contamination provient surtout de l'extérieur de l'œuf par souillure de sa surface de matières fécales contaminées. Quant à ceux présentant une mortalité embryonnaire, ils ont été contaminés par pénétration d'*Escherichia coli* pathogène à travers la coquille. La plus importante source de contamination des œufs semble provenir de la contamination en surface avec pénétration ultérieure des colibacilles de la coquille et de sa membrane.

Les colibacilles sont retrouvés dans les matières fécales et la litière. Après dessiccation, les poussières peuvent contenir jusqu'à 10^5 à 10^6 d'*E. coli* / gramme. Ces bactéries persistent longtemps surtout par climat sec. (Barnes *et al*, 1997)

Des souches pathogènes peuvent se retrouver dans un élevage par simple contamination de sa source d'eau. (Nagi et Raggi, 1992)

La maladie peut être d'origine primaire ou secondaire : l'intervention unique du colibacille est rare et provient de souches très virulentes (primaire) ; alors que la maladie est très souvent secondaire, provoquée par des fautes d'élevage aggravées par la présence d'agents infectieux (mycoplasmes ou virus par exemple) ou à la suite d'un stress quelconque.

La maladie est représentée par un ensemble d'entités pathologiques évoluant séparément ou de façon plus ou moins mêlée. Ces maladies colibacillaires touchent essentiellement les jeunes oiseaux du fait de leur système immunitaire immature et d'une flore intestinale incomplète d'où absence de l'effet de barrière. (Villate, 2001 b)

Cette maladie est l'une des dominantes pathologiques en aviculture et fait suite le plus souvent à une mauvaise gestion des élevages. (Bouzoubaa *et al.*, 1989)

2.4 CARACTERISTIQUES DES SOUCHES PATHOGENES D'*ESCHERICHIA COLI*

2.4.1 SEROTYPES

Plusieurs sérotypes d'*Escherichia coli* sont classés selon le schéma d'Ewing (Barnes *et al.*, 1997).

D'après les recherches menées de part le monde, les sérotypes d'*E. coli* sont impliqués dans l'apparition des pathologies aviaires ; Siccardi en 1966, a trouvé que sur 154 sérotypes d'*E.coli* identifiés 74 sérotypes (soit 48%) sont pathogènes pour la volailles. Parmi ces sérotypes pathogènes et identifiés par leur antigène somatique (O), on a : O1, O2, O3, O6, O8, O15, O18, O35, O71, O74, **O78**, O87, O88, O95, O103 et O109. Dans le monde bactérien, les sérotypes O1, O2 et **O78** sont de loin les plus communs et les plus fréquemment retrouvés. (Sojka et Carnaghan, 1961, cités par Gross, 1990)

L'identification d'un sérotype se fait par ses antigènes majeurs (O, K, H et F) ; actuellement on en dénombre que : 173 O, 74 K, 53 H et 17 F. (Lior, 1994 ; Wray et Woodward, 1994)

Ce n'est qu'après quelques années que les plus importants sérotypes pathogènes aviaires reconnus sont : O1, O2, O35 et **O78**. Récemment, 625 sérotypes ont été identifiés. Sur des études menées sur 458 souches d'*E. coli* aviaires prélevés de poulets présentant des lésions de

colisepticémie, 62 sérotypes différents furent isolés ; quoiqu'il en soit, 59% d'entre eux appartiennent à l'un des 18 sérotypes suivants : O1, O2, O5, O8, O12, O14, O15, O18, O20, O53, **O78**, O81, O83, O102, O103, O115, O116 et O132. Quant au sérotype O139, il fut le seul isolé à partir du foie. (Blanco *et al*, 1998 ; Mokady *et al.*, 2005)

2.4.2 FACTEURS DE VIRULENCE

Les souches d'*E.coli* responsables de colibacillose aviaires sont des *E.coli* pathogènes qui empreignent la circulation sanguine pour envahir tous l'organisme ; leur pathogénie est identique à celles des *E.coli* responsables d'infections extra-intestinales chez l'homme ; il n'est donc pas surprenant que le facteur de virulence soit en rapport directe avec la bactérie. Ces facteurs sont représentés par: les pili, le système aérobactine (système de captation du fer) et la production d'antigène de surface. (Chabanon *et al.*, 1982 ; Blanco *et al.*, 1992 ; Wooley *et al.*, 1992 ; Villate, 2001 a ; Tivendale *et al.*, 2004)

La souche d'*E.coli* O2:K1:H7, isolée lors d'une maladie respiratoire à partir d'une cellule pharyngienne d'un poulet, a présentée un gène responsable de la production de l'aérobactine. (Bree *et al*, 1989)

2.4.2.1 Pili (facteur d'adhésion)

La capacité que possède la souche pathogène d'*E.coli* à adhérer à l'épithélium de surface du tractus respiratoire des oiseaux est très importante car elle exprime son facteur de virulence (responsable de la colibacillose aviaire). Cette capacité d'adhésion se fait grâce à un support puissant : les pili. (Villate, 2001 a)

Une étude effectuée sur trois souches d'*E.coli* (O1, O2 et **O78**) provenant de poulets atteints de colisepticémie, a montré que ces souches produisent des pili à 37°C et non à 18°C ; il s'en suivi après inoculation de ces dernières, une maladie respiratoire manifestement plus importante que celle observée sur les poulets inoculés avec des bactéries dépourvues de pili, ceci démontre que les souches présentant des pili (aussi bien in vitro qu'in vivo) adhèrent aux cellules épithéliales trachéales et sont responsables de l'apparition d'une maladie respiratoire sévère. (Naveh *et al*, 1984)

2.4.2.2 Le système aérobactine

On le retrouve chez les bactéries pathogènes responsables de septicémies aviaires. Il permet la captation du fer essentiel à la multiplication bactérienne. Ce système est composé

d'une molécule simple (l'aérobactine) et d'un récepteur spécifique à cette molécule (la protéine lut A). Lors de carences en fer libre dans les liquides organiques, l'aérobactine est synthétisée par la bactérie, puis excrétée dans le substrat. Elle forme un complexe réversible avec le fer ferrique de l'organisme puis revient se fixer à son récepteur pour pénétrer dans la bactérie où elle libère son fer. (Villate, 2001 a)

2.4.2.3 Antigène capsulaire (K1)

Les souches d'*E.coli* responsables de septicémies aviaires appartiennent à un nombre limité de sérotypes O et K. Les sérotypes prédominants sont O1, O2 et **O78** et possèdent les antigènes de surface suivants : K1 pour les deux premiers et K80 pour le troisième. L'antigène K1 est toujours associé à des infections extra-intestinales humaines et animales alors que l'antigène **K80** est spécifique aux volailles. (Bree *et al*, 1989)

Ces facteurs de virulences d'*Escherichia coli* prélevée de la flore fécale de poulet de chair atteint de dermatite nécrosante sont similaires à ceux retrouvés dans d'autres lésions de colibacillose aviaire (colisépticémie). (Gomis *et al.*, 2001 ; Guimaraes de Brito *et al.*, 2003)

Les souches d'*Escherichia coli* possédant les gènes qui codent pour certains facteurs de virulence, sont transmis à l'homme par la voie alimentaire (viande). (Andral *et al.*, 2004)

2.5 LES DIFFERENTES ENTITES PATHOLOGIQUES

Les infections aviaires à *Escherichia coli* comprennent plusieurs entités pathologiques que voici :

2.5.1 MORTALITE EMBRYONNAIRE (YOLK SAC INFECTION)

Escherichia coli est un germe opportuniste qui devient pathogène par le biais d'autres agents pathogènes. On le retrouve au niveau des incubateurs et éclosiers où il sera responsable de la contamination des œufs et des poussins par suite de mauvaises conditions de température et d'hygrométrie. (Merck *et al*, 1977)

La contamination du sac vitellin survient à l'intérieure des incubateurs entraînant ainsi la mort de plusieurs embryons. La souche O1:K1 est responsable de cette mortalité embryonnaire faisant suite à une atteinte du sac vitellin. (Gross, 1990)

2.5.2 MORTALITE DU JEUNE POUSSIN (OMPHALITE)

Cette bactérie est responsable d'une omphalite provoquant chez les poussins quelques heures seulement avant la mort, de l'abattement, de la faiblesse, de la déprime, de l'hypothermie avec les ailes pendantes et un ombilic infecté non cicatrisé (72 heures après l'éclosion). Les poussins présentent un ventre mou et flasque, une très mauvaise odeur, un ombilic enflammé avec formation de croûtes, un sac vitellin non résorbé, d'épais placard jaunâtre sur les organes abdominaux (signe de péritonite) et une péricardite et périhépatique fibrineuses (signes pathognomoniques). (Lesbouyries, 1965 ; Merck *et al*, 1977)

2.5.3 COLIBACILLOSE RESPIRATOIRE (AEROSACCULITE)

La maladie respiratoire est assez complexe ; elle peut faire suite à une infection primaire ou secondaire (le plus souvent) à *Escherichia coli*. Elle survient entre 2 et 12 semaines d'âge avec des pertes importantes vers la 4^{ème} et 9^{ème} semaine où l'on note : une diminution de la croissance, une diminution de l'indice de consommation, une augmentation de la mortalité et une saisie des carcasses de poulets de chair au niveau des abattoirs.

La pathologie survient soit directement, après inhalation de poussières chargées d'*E. coli* pathogènes provenant de fientes desséchées et contaminées ; soit indirectement, par la présence d'autres pathologies concomitantes (Maladie de New Castle, Bronchite Infectieuse, Mycoplasmoses) qui augmentent son expression clinique. L'état de stress et la vaccination vont accroître cette infection respiratoire. (Gross, 1990)

2.5.4 COLISEPTICEMIE

La colisepticémie présente une évolution subclinique (et donc inapparente) lorsque l'agent primaire d'infection est seul à intervenir, et ses principaux symptômes sont l'indifférence et le refus de boire et de manger. La mortalité dépasse rarement 5% mais peut s'élever en cas de surinfections et la morbidité est souvent supérieure à 20%. Les pertes économiques qu'elle engendre font suite à un retard de croissance et une qualité de carcasse basse entraînant des saisies au niveau des abattoirs. (Gordon, 1979)

La colisepticémie aiguë est une infection provoquée par l'invasion de colibacilles affectant les jeunes poulets de chair. On note des mortalités brutales après abattement et anorexie, et des complications de colibacillose respiratoire, d'omphalite ou de synovite.

Elle se caractérise par des lésions non exsudatives avec un foie hypertrophié, sombre ou verdâtre présentant quelques zones de dégénérescence, une rate hypertrophiée avec des points de

nécrose, un rein présentant une néphrite et des dépôts d'urates, un intestin avec une ampoule cloacale distendue par des gaz et des matières liquides blanchâtres, une légère ascite (liquide abdominal inflammatoire conférant aux viscères cet aspect brillant) et enfin, une congestion des muscles pectoraux. Le jabot est presque toujours plein et les oiseaux présentent un état général satisfaisant. Dans certains cas, on note la présence d'une péricardite et d'une péritonite. (Villate, 2001 b)

Lors d'une infection septicémique sévère, les poulets atteints présentent des fientes humides et jaunâtres avec une perte de poids rapide et importante. Sur trois souches d'*E.coli* (O1, O2 et O78) provenant de poulets atteints de colisepticémie, le sérotype prédominant semble être la **O78:K80**. (Barbour *et al*, 1985 ; Curtis *et al*, 1981 ; Arp, 1982 ; Dominick *et al*, 1984 ; Naveh *et al*, 1984 ; Blanco *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2005 ; Lamarche *et al.*, 2005)

D'autres études parle de la souche **O78:K80:H9**, comme étant la souche responsable de lésions septicémiques et hépatiques. (Arp, 1985)

2.5.5 SALPINGITE ET OVARITE

La salpingite fait suite en générale à une atteinte du sac aérien abdominal gauche par contiguïté d'organe. Elle évolue vers la chronicité et se caractérise par la présence d'une énorme masse caséuse et dilatée avec une paroi fine de l'oviducte. Cette masse caséuse renferme des cellules nécrotiques et des bactéries qui persistent plusieurs mois. Les dimensions de cette masse caséuse peuvent augmenter avec le temps. Les femelles atteintes meurent le plus souvent pendant les 6 premiers mois après contraction de la maladie ; celles qui survivent pondent rarement des œufs. (Bisgaard, 1995)

On note également chez les poules pondeuses des lésions d'ovarite qui se caractérisent par une ponte intra abdominale d'ovules infectés, à aspect cuit, responsables d'une péritonite et la mort de l'animal. (Villate, 2001 b ; Simon, 2001)

2.5.6 PERITONITE

La péritonite est provoquée par les colibacilles et survient après prolifération de ces dernières. Elle peut donc faire suite à une salpingite, une aérosacculite, une omphalite, une entérite, une colisepticémie ou une coligranulomatose et apparaît dans la cavité abdominale par contiguïté de tissu. (Stordeur *et al*, 2001)

2.5.7 ENTERITE

Certaines études effectuées sur *Escherichia coli*, rapportent que ce dernier n'est pas le seul responsable de l'entérite aviaire. La présence de part le monde, de sérotypes pathogènes d'*Escherichia coli* dans le tractus intestinal n'est associé à aucune maladie spécifique. Ces souches pathogènes vont soit préparer le terrain à d'autres pathologies (facteurs prédisposants), soit accentuer l'expression clinique en se greffant à des germes préexistants (facteurs déclenchants). (Joya *et al*, 1990)

Une double infection à *Escherichia coli* et *Eimeria tenella* fut responsable d'une entérite hémorragique sévère. (Nakamura *et al*, 1990)

L'entérite se manifeste au tout début par des diarrhées et est associée à une *E. coli* entérotoxigène qui apparaît rarement. Cette entérotoxine thermolabile (LT) retrouvée parmi les souches d'*E. coli* aviaires présente des similitudes avec la *E. coli* entérotoxigène humaine. (Joya *et al*, 1990)

2.5.8 COLIGRANULOMATOSE (MALADIE DE HJARRE)

Une forme très particulière de la colibacillose aviaire est la coligranulomatose. Cette affection du tube digestif est caractérisée par des granulomes intestinaux, mésentériques et hépatiques accompagnés d'ascite et évoluant le plus souvent vers la mort par cachexie. (Fontaine et Cadore, 1995 (a) ; Villate, 2001 b)

2.5.9 SWOLLEN HEAD SYNDROME (S.H.S.)

S.H.S. se caractérise par un œdème de la tête atteignant la crête et le pourtour des yeux chez les poulets de chair et les reproducteurs. *Escherichia coli* peut être isolé à partir de ces lésions. (O'Brien, 1985)

Cette maladie bactérienne est toujours associée à un coronavirus d'où l'ampleur des lésions qui consistent en la présence d'un œdème gélatineux sous la peau de la face et dans les tissus péri-orbitaires et d'un exsudat caséux dans le sac conjonctival, les tissus sous-cutanés de la face et les glandes lacrymales. (Pattison *et al*, 1989 ; Nunoya *et al*, 1991)

2.5.10 DERMATITE NECROSANTE (CELLULITIS)

Elle ne présente aucun signe clinique et se caractérise par la présence de plaques fibrineuses évoluant vers des croûtes nécrosantes sous la peau. Il n'y a pas de mortalité et les

perles se voient au niveau des abattoirs par la saisie des carcasses des poulets de chair. (Vaillancourt *et al*, 1992)

Escherichia coli est l'agent pathogène prédominant et les sérotypes fréquemment responsables de cette entité pathologique sont **O78:K80**, O1:K1 et O2:K1 isolés à partir des lésions sous-cutanées. (Glunder, 1990 ; Peighambari *et al*, 1993)

La pathologie fut reproduite expérimentalement par inoculation du sérotype O78:K80 qui fut isolé par la suite à partir des follicules plumeux.

Quant au sérotype O1:K1, il fut isolé à partir des lésions sous-cutanées puis inoculé à des poulets reproduisant les mêmes lésions. (Glunder, 1990)

2.5.11 ARTHRITES ET SYNOVITES

Les colibacilles viennent surinfecter des maladies primitives, telles que : l'arthrite (induite par un réovirus) et la synovite (induite par *Mycoplasma synovia*). (Villate, 2001 b)

L'arthrite se rencontre le plus souvent au niveau du tarse, chez les poulets de chair, en général, qui ont survécu à une attaque de colisepticémie et se caractérise par l'isolement d'*Escherichia coli* dans le pus qui s'écoule de l'articulation infectée, ce qui permet de la différencier des autres affections (boiteries dues à d'autres étiologie). (Gordon, 1979)

2.6 DIAGNOSTIC

Le diagnostic se base sur la clinique (symptômes et lésions), mais l'isolement d'*E. coli* d'une lésion typique est le meilleur moyen de confirmer une atteinte colibacillaire. Les prélèvements doivent provenir des organes ou tissus lésés, tels que le foie, la rate, le péricarde et la moelle, et se faire proprement de façon à éviter toute contamination avec le contenu intestinal. Les milieux de culture utilisés sont les géloses de Mac Conkey et de l'EMB (Eosin Methylene Blue). Le diagnostic est confirmé par la présence de colonies luisantes et roses sur Mac Conkey et de colonies luisantes d'aspect métallique sur EMB. Certains test biochimiques, telles que : la fermentation du lactose, la production d'indole, l'absence de production d'uréase et d'hydrogène sulfuré et la non utilisation de citrate comme source de carbone viennent compléter le diagnostic (parfois tardivement).

Pour certaines souches, le diagnostic paraclinique doit être plus poussé, surtout si les colonies isolées appartiennent à des sérotypes tels que : O1, O2 ou **O78:K80**. Ce genre d'investigation est réalisable et nécessite l'utilisation de produits spécifiques (sérum spécifique) ou se fait au niveau de laboratoires spécialisés. Il s'agit du sérotypage qui s'effectue par un

simple test d'agglutination. Ce test n'est effectué que dans le cadre d'une étude épidémiologique ou de travaux de recherches. (Stordeur *et al*, 2001)

Comme on ne peut identifier toutes les souches pathogènes par de simples tests biochimiques, un test de détection de l'Aérobactine (test Aérobactine) fut mis au point par l'INRA pour repérer les souches pathogènes non typables pour lesquelles il était impossible jusqu'alors de fournir une réponse sur la seule base de la sérotypie. (Villate, 2001 b)

2.7 TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

2.7.1 TRAITEMENT

Le traitement fait appel à des règles usuelles de l'antibiothérapie en ayant recours systématiquement à l'antibiogramme suite aux antibiorésistances observées.

Parmi les produits les plus utilisés dans le traitement des colibacilloses, on a : les sulfamides potentialisés (triméthoprim et sulfaquinoxaline) ; la soframycine ; la fluméquine ; l'apramycine (sulfate). (Lecoanet, 1992)

Certaines souches d'*E.coli* sont sensibles aux médicaments, tels que : l'ampicilline, la chlortétracycline, l'oxytétracycline, la néomycine, la gentamicine, les nitrofuranes, l'acide nalidixique, le triméthoprim-sulfaméthoxine, la polymyxine B et les sulfonamides. ; mais les souches d'*E.coli* provenant des élevages avicoles se montrent particulièrement résistants à ces anti-infectieux. (Cloud *et al*, 1985 ; Gross, 1990)

Des études menées au niveau du D.I.L.D. (the Disease Investigation Laboratory for Diagnosis) en Inde ont montré que sur 98 souches d'*E.coli* isolés à partir d'oiseaux atteints de colibacillose, 80% des souches sont sensibles à la norfloxacine, 75% à la néomycine, 60% aux nitrofuranes, 35% au chloramphénicol, 34% à la gentamicine, 15% à la céphaloridine, 10% à la kanamycine, 10% à la lincomycine, 5% à l'oxytétracycline et 2% à l'ampicilline. (Dasgupta *et al*, 1995)

2.7.2 PROPHYLAXIE

Si les oiseaux peuvent survivre aux infections d'*E.coli* en seulement 5 jours, leurs anticorps deviennent des composantes majeures de leur système immunitaire et la présence de ces derniers est décelée par un système très efficace : le test d'ELISA. Seulement, dans certaines infections sévères, la détection des niveaux d'anticorps peut ne pas se produire.

Les volailles ne développent pas naturellement leur immunité contre les sérotypes pathogènes d'*E.coli* par simple inhalation régulière des poussières les contenant. (Heller *et al*, 1990)

La vaccination contre *E.coli* n'est pas largement employée, peut être, à cause du nombre important de sérotypes impliqués dans les colibacillooses aviaires. Le coût de vaccination peut également en être la cause ; de plus, aucun vaccin n'est disponible pour lutter efficacement contre la colibacillose.

Dans la majorité des cas, la prévention reste difficile d'autant plus que les sérotypes pathogènes impliqués sont nombreux et différents. Le traitement est presque inefficace à partir du moment où les sujets montrent une antibiorésistance ou la développent. Par conséquent, une antibiothérapie ciblée et une prophylaxie adéquate sont les seuls moyens de lutte contre cette maladie. (Stordeur *et al*, 2001)

3. APPROCHE PHARMACOLOGIQUE SUR LES QUINOLONES

3.1 GENERALITES

Les quinolones forment une famille d'antibactériens de synthèse qui présente une activité bactéricide orientée principalement vers les bacilles à Gram négatif et une toxicité relativement faible. (Fontaine, 1988)

Cette famille d'antibiotique a vu le jour avec l'apparition d'une molécule ayant la structure d'une quinolone et dénuée de toute activité biologique et fut décrite par Price (en 1949) puis Barton (en 1960); ce n'est qu'en 1962, après isolement d'une molécule à activité bactérienne « l'acide 6-chloro-1-H-éthyl-4-oxoquinoline-3-Carboxylique », que la première molécule de quinolone aux propriétés antimicrobiennes fut découverte par Lesher, il s'agit de « l'acide nalidixique » qui a été isolé à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme. Depuis, 10000 dérivés ont été synthétisés. (Clifford, 1992 ; Carbon *et al*, 1994 ; Bryskier *et al*, 1995)

Ces antibiotiques sont utilisés aussi bien en médecine humaine (traitement des infections urinaires) qu'en médecine vétérinaire (traitement des infections à localisations diverses et traitement de choix contre les colibacilles). (Mogenet *et al*, 1997)

En comparaison avec les antibiotiques naturels, le risque d'apparition de résistance par réplication des plasmides est relativement faible à l'inverse des résistances chromosomiques qui augmentent considérablement en particulier chez les souches d'*E. coli* enteropathogènes. (Fontaine, 1988)

L'apparition de bactéries résistantes aux quinolones chez les animaux constitue un risque pour la santé humaine car ces bactéries peuvent être pathogènes pour l'homme ou peuvent transmettre cette résistance à des bactéries potentiellement pathogènes. (Mellata *et al*, 1998 ; Garau *et al*, 1999; Webber *et al*, 2001)

L'intérêt d'étudier ces molécules est d'évaluer leur éventuelle baisse d'activité. Sachant que la flore digestive constitue un réservoir de bactéries résistantes du fait qu'elle soit soumise à la présence de l'antibiotique lors d'un traitement ; il est important de se tracer l'objectif suivant : décrire la résistance aux quinolones chez *Escherichia coli* de la flore fécale dans les élevages avicoles de poulet de chair, dans un contexte d'utilisation de ces molécules en prenant à titre d'exemple la fluméquine (et l'enrofloxacin à titre comparatif).

Cette étude bibliographique des quinolones porte aussi bien sur les quinolones employées en médecine vétérinaire que sur celles employées en médecine humaine puisque l'étude

expérimentale fait appelle aux quinolones du domaine vétérinaire (fluméquine et enrofloxacin) utilisées sur les animaux, et aux quinolones du domaine médical (fluméquine, norfloxacin, pefloxacin et ciprofloxacin) utilisées pour l'antibiogramme.

3.2 CLASSIFICATION

Les quinolones sont classés selon la chronologie de leur découverte et selon leur activité anti-bactérienne.

En médecine humaine, Les quinolones ont fait leur apparition avec la synthèse de l'acide nalidixique (en 1962), première molécule de quinolone à activité antibiotique, qui a donné naissance d'abord à l'acide oxolinique (en 1968) puis, en 1970, à plusieurs autres dérivés (acide pipémidique, acide piromidique, cinoxacin, fluméquine) ; ces derniers furent tous regrouper dans une seule et même famille : la famille des quinolones de première génération (classiques). Différents de part certaines modifications du spectre antibactérien et des paramètres pharmacocinétiques, ces quinolones de première génération ont en commun deux caractères essentiels :

- Un spectre antibactérien étroit, orienté essentiellement sur les entérobactéries,
- Une pharmacocinétique limitée, ne permettant leur utilisation qu'en tant qu'antiseptiques urinaires.

Avec l'apparition, en 1980, des fluoroquinolones pipérazinées systémiques ou quinolones de deuxième génération (fluoroquinolones), telles que la ciprofloxacin, la lévofloxacin, l'ofloxacin, la pefloxacin, la rosoxacin, l'énoxacin, la norfloxacin, etc, la chimiothérapie anti-infectieuse a connu un énorme progrès. En effet, cette deuxième génération de quinolones présente un spectre d'action beaucoup plus élargit et une pharmacocinétique importante permettant leur utilisation dans toutes les localisations infectieuses. Cette génération de fluoroquinolones comprend également le groupe des « aminofluoroquinolones », avec la loméfloxacin et la sparfloxacin.

Malgré leurs différences, ces deux générations de quinolones ont en commun : un mode d'action identique, par inhibition de la sous-unité A de l'ADN-gyrase bactérienne, et une résistance bactérienne exclusivement chromosomique. (Maur, 1990 a ; Moulin et Coquerel, 2002)

Dans le domaine vétérinaire, les quinolones sont classées en trois générations :

- Les quinolones de première génération sont représentées par l'acide nalidixique (1962) et l'acide oxolinique (1968) (Puyt, 1992) et présentent un spectre d'action très étroit (action sur les entérobactéries seulement (Gram négatif)).
- Les quinolones de deuxième génération sont représentées principalement par l'acide pipémidique, l'acide piromidique, la cinoxacine et la fluméquine (1970) avec les propriétés suivantes :
 - Spectre d'action sur les G^- et quelques G^+ (staphylocoques),
 - Antiseptiques urinaires ou digestifs (élimination rapide et taux tissulaire réduit).

Pour la fluméquine administrée per os, on note :

- Bonne diffusion tissulaire,
- Faible toxicité,
- Délais d'attente court (2 jours).
- Les quinolones de troisième génération ou fluoroquinolones sont représentées par l'enrofloxacin (1991), la marbofloxacin (1995), la danofloxacin (1996), la difloxacin (1998), l'orbifloxacin (2000) et l'ibafloxacin (2001) et nous offrent des propriétés plus intéressantes que les précédentes, à savoir :
 - Spectre élargi (G^- , G^+ et Mycoplasmes),
 - Bonne distribution tissulaire.

(Maur, 1990 a ; Maur, 1990 b ; Puyt, 1992 ; Brion *et al*, 1992 ; Fontaine et Cadore, 1995 a ; Moulin et Coquerel, 2002)

La seule molécule qui présente une particularité dans sa classification est la fluméquine ; en effet, si on prend en considération sa structure (présence d'un atome de fluor), on a tendance à la classer avec les fluoroquinolones (quinolones de troisième génération) et si l'on tient compte que de son spectre d'action, on la classera avec les quinolones de deuxième génération. Ne considérant que ses propriétés de spectre d'action et de distribution tissulaire, la fluméquine rejoint donc les quinolones de deuxième génération. (Maur, 1990 b)

En résumé, la classification des quinolones se fait selon la structure moléculaire, le mode d'action et la chronologie de leur apparition. (cf. **Figure 11** : Classification Des Quinolones)

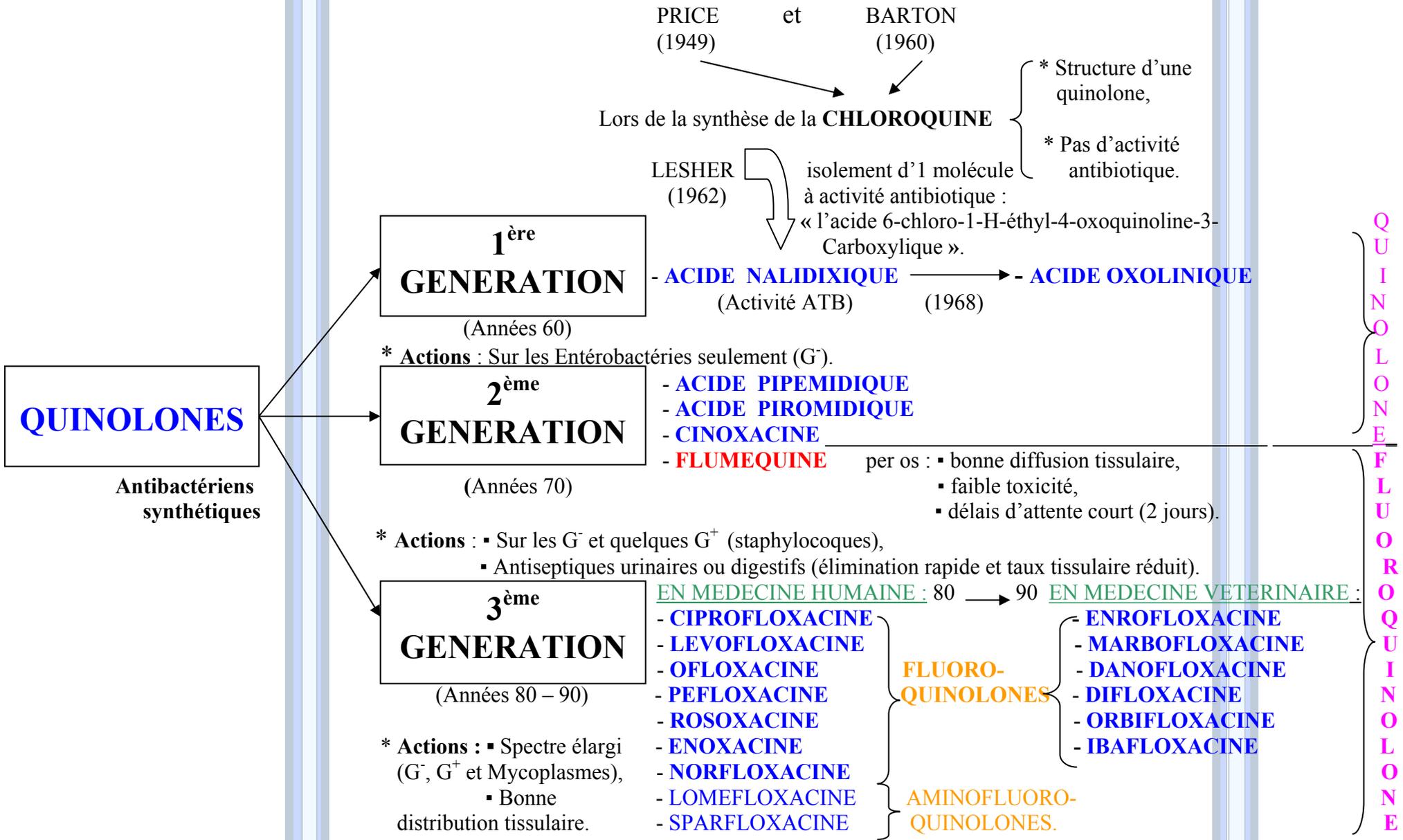


Figure 11 : Classification Des Quinolones

3.3 STRUCTURE

C'est une famille d'antibactériens de synthèse, caractérisés par une structure aromatique plane pouvant s'insérer dans la molécule d'ADN et qui est à la base de leur activité antibactérienne. (Maur, 1990 a ; Clifford, 1992)

3.3.1 Composition Chimique

Les quinolones présentent pour la plupart, une structure bicyclique, à l'exception de la fluméquine, de l'acide oxolinique et de la cinoxanine qui présentent une structure tricyclique. Le premier cycle est un noyau pyridine avec une fonction cétone en 4, un groupe carboxylique en 3 ; et un deuxième cycle accolé au noyau pyridine. Les quinolones présentent également des substitutions assez variées (éthyle, méthyle et autres), portées par les noyaux de pyridine formant les cycles. (Maur, 1990 a ; Clifford, 1992 ; Jawetz *et al.*, 1995)

Les fluoroquinolones sont des dérivés de la quinoléine (acide quinoléine 3-carboxylique). Ce sont des molécules planes qui possèdent :

- Deux cycles aromatiques accolés : le premier est un cycle pyridine et le deuxième est un hétérocycle comportant soit un cycle pyridine soit un cycle benzène,
- Une fonction cétone en position 4,
- Une fonction carboxylique-COOH en position 3.

(The Merk Veterinary Manual, 1991; Clifford, 1992; Jawetz *et al.*, 1995)

La structure hétérocyclique N-éthyl pyridone est un noyau pyridine porteur d'une fonction cétone et d'une chaîne éthyle sur l'azote nitrocyclique. Une fonction acide carboxylique est greffée en ortho de l'azote nitrocyclique. Un ou plusieurs cycles, parfois azotés, s'ajoutent à cette structure de base formant ainsi un noyau pyrimidique. (Fontaine et Cadore, 1995 a ; Jawetz *et al.*, 1995)

Les quinolones sont donc constituées d'une structure bicyclique hétéroaromatique, combinant la pyridone carboxylée et un noyau aromatique, sur laquelle se greffent des substituants permettant de différencier les molécules entre elles. (Clifford, 1992 ; Bryskier *et al.*, 1995)

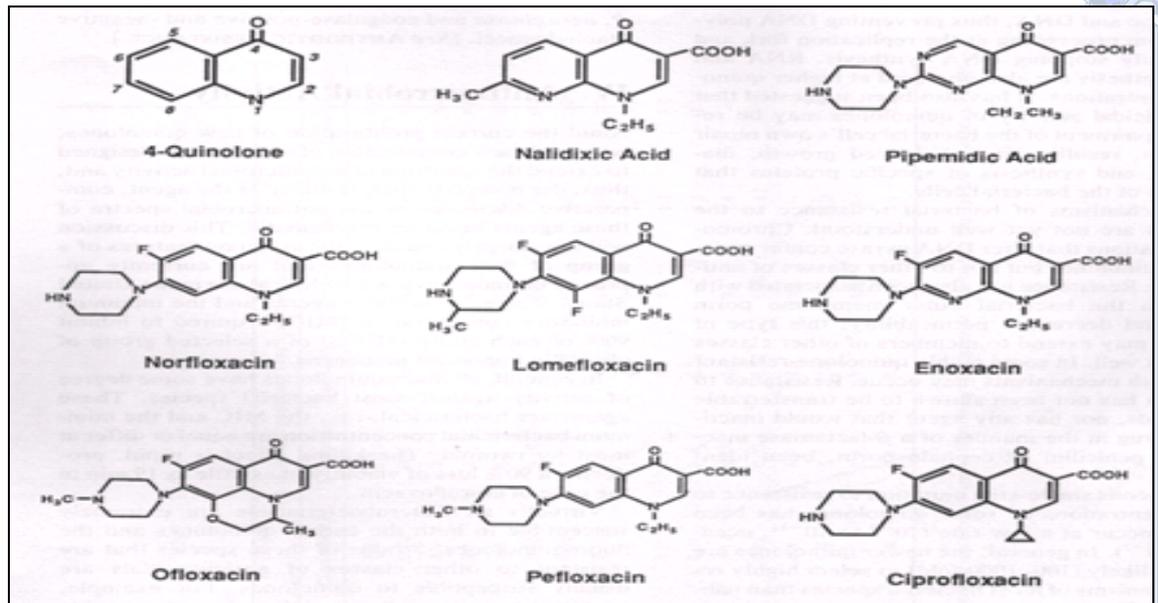


Figure 12 : Structure chimique de quelques quinolones. (Clifford, 1992)

3.3.2 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les quinolones en générale, se présentent sous forme de poudres cristallines, de couleur blanche à jaune, insolubles ou peu solubles dans l'eau et solubles au pH alcalin ; d'où la classification suivante :

- Lipophiles : c'est le cas de l'acide nalidixique, l'acide oxolinique, la fluméquine, la péfloxacine et la difloxacine.
- Hydrophiles : comme l'acide pipémidique, la ciprofloxacine, l'énofloxacine et la norfloxacine.
- Intermédiaires : comme la loméfloxacine et l'ofloxacine.

Les quinolones sont des acides faibles de par leur fonction acide carboxylique – COOH.

(Maur, 1990 a ; Fontaine et Cadore, 1995 a)

Les fluoroquinolones sont liposolubles sous leur forme non ionisée et hydrosolubles sous leur forme ionisée. Elles présentent une légère instabilité à la lumière. Elles ont des propriétés chélatrices dues à la présence d'une fonction cétonique qui permet d'expliquer l'activité antibactérienne par le blocage de la DNA-gyrase. Elles présentent un groupement carboxylique (COOH) qui permet la fabrication de sels de sodium facilement ionisables et dissociables et donc hydrosolubles. (The Merk Veterinary Manual, 1991)

Elles fixent certains cations bivalents comme le magnésium et le cuivre. (Lecompte *et al*, 1998)

La présence d'un hétérocycle azoté saturé est responsable du caractère amphotère qui agit sur la pharmacocinétique de la quinolone. (The Merk Veterinary Manual, 1991)

3.4 PHARMACOCINETIQUE

La pharmacocinétique est l'étude du devenir, ou métabolisme, des molécules médicamenteuses dans l'organisme. Ces dernières vont passer par différentes étapes :

3.4.1 RESORPTION

Elle diffère selon la voie d'administration. Par voie orale (plus fréquente), la résorption est rapide et plus ou moins complète (80 à 90%) avec des pics plasmatiques entre 30 mn et 2 h. Pour la voie parentérale (peu fréquente), la résorption est rapide avec un pic plasmatique à 6 h pour l'I.M. (Clifford, 1992 ; Fontaine et Cadore, 1995 a)

3.4.2 DISTRIBUTION

La distribution des quinolones est l'étape où la molécule se diffuse dans l'organisme pour rejoindre les lieux de son action biologique. Elle est de type extra-cellulaire et le volume de distribution des quinolones est faible (< 1L/kg). Elles diffusent principalement dans les tissus richement vascularisés (foie et reins). Les quinolones de 2^{ème} et 3^{ème} génération, de part leur caractère amphotère, ont une répartition plus homogène et plus large dans l'organisme avec un volume de distribution compris entre 1 et 2 L/kg, il peut arriver à 2,9 L/kg chez la poule pour la difloxacin. (Brown, 1996)

3.4.3 DEMI-VIE

Du fait de leur caractère acide, la fixation sur les protéines plasmatiques va se faire de façon importante (80-90%) pour l'acide nalidixique et l'acide oxolinique ; et de façon moindre (30-40%) pour l'acide pipémidique. La cinétique sanguine est rapide en générale, en raison de l'élimination rénale importante. Les demi-vies plasmatiques vont de 1:30 h pour l'acide nalidixique à 7 h pour la fluméquine. Quant à la pénétration tissulaire, elle est assez moyenne du fait de leur caractère acide et les concentrations tissulaires sont inférieures aux concentrations sanguines (sauf pour le rein). (Fontaine et Cadore, 1995 a)

3.4.4 METABOLISME (BIOTRANSFORMATION)

Les quinolones subissent deux principales biotransformations : l'hydroxylation (entraînant la formation de métabolites longuement actifs) et la glucoronocouplage (entraînant la formation de métabolites hydrosolubles inactifs et facilement éliminables). (Puyt, 1992 ; Mogenet et Fedida, 1997)

3.4.5 ÉLIMINATION

Elle est essentiellement rénale et se fait par filtration glomérulaire et réabsorption tubulaire après glucorono-conjugaison. L'élimination dans l'urine est de 24 h pour l'acide nalidixique et la fluméquine ; elle est presque totale pour l'acide nalidixique et de 60-90% pour la fluméquine. L'élimination est donc rapide et se fait principalement par voie rénale. (Fontaine et Cadore, 1995a)

3.5 ACTIVITES THERAPEUTIQUES (ANTIBACTERIENNE)

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides, le rapport CMB/CMI (Concentration Minimale Inhibitrice / Concentration Minimale Bactéricide) est généralement de 2 à 8 pour les quinolones de 1^{ère} et 2^{ème} génération et de 1 à 4 pour celles de 3^{ème} génération. (The Merk Veterinary Manual, 1991)

3.5.1 SPECTRE D'ACTIVITÉ

Le spectre d'activité est très variable et dépend des quinolones employés qui sont en générale, actives contre les bactéries Gram négatif en l'occurrence les entérobactéries.

Les quinolones de 1^{ère} génération présentent un spectre étroit, limité aux bactéries Gram négatif ; ceux de la deuxième génération ont un large spectre, par la présence de l'atome de fluor (Barry *et al*, 2001) et sont efficace contre les Gram positif. Concernant les quinolones de 3^{ème} génération, le spectre d'activité est plus élargit et touche *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* et *Corynébactérium*. (The Merk Veterinary Manual, 1991)

La fluméquine est active sur les germes à Gram négatif tels que : *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Aéromonas* et sur les germes à Gram positif : *Staphylocoques pyogènes* et présente une CMI relativement basse de l'ordre de 0.4 à 1µg/ml offrant ainsi une activité antibactérienne intéressante à faible dose. (Fontaine et Cadore, 1995 a)

L'activité antibactérienne des quinolones sur les entérobactéries (exprimée par les CMI) se classe dans l'ordre suivant : cinoxacine > acide nalidixique > acide piromidique > acide pipémidique > acide oxolinique et fluméquine. (Maur, 1990 a)

3.5.2 MECANISME D'ACTION

Les quinolones agissent sur deux cibles spécifiques : la topoisomérase II (ou ADN-gyrase) et la topoisomérase IV, enzymes bactériens responsables de la conformation topographique de

l'ADN par la réplication et la ségrégation des chromosomes et des plasmides. (The Merck Veterinary Manual, 1991 ; Clifford, 1992)

Les quinolones sont des agents antibactériens à action bactéricide sur les bactéries en voie de multiplication rapide. Ils agissent par blocage de la réplication de l'ADN bactérien, en inhibant l'ADN polymérase. (Fontaine et Cadore, 1995 a)

3.5.3 ROLE DES TOPOISOMERASES DE TYPE II (ou ADN-gyrase) ET DE TYPE IV

Ces deux enzymes régulent le degré de surenroulement négatif de l'ADN bactérien. Ils sont capables de séparer ou d'enlacer des ADN circulaires bicaténaires en réalisant une coupure simultanée des deux brins d'un des deux ADN, puis en faisant passer l'autre ADN à travers cette coupure. (Hoshino *et al*, 1994)

La DNA-gyrase est constituée de deux sous-unités A codées par le gène *gyrA* et deux sous-unités B codées par le gène *gyrB*. Son rôle est de maintenir un certain degré d'enroulement négatif de l'ADN. Elle facilite le déplacement des complexes de réplication et de transcription en ajoutant un surenroulement négatif en amont des complexes. Elle élimine les nœuds apparaissant dans l'ADN et aide à la formation des boucles et des replis de l'ADN. (Hoshino *et al*, 1994)

La topoisomérase IV comporte deux sous-unités C codées par le gène *gyrC* et deux sous-unités E codées par le gène *gyrE*. Elle présente une activité de décaténation (séparation des chaînes d'ADN après réplication) qui est 5 fois plus importante que celle de relâchement des ADN surenroulés. (Hoshino *et al*, 1994)

La DNA-gyrase intervient principalement lors des phases d'initiation et d'élongation de la réplication, alors que la topoisomérase IV intervient lors de la phase de terminaison. (Luttinger, 1995)

3.5.4 MODE D'ACTION

Les quinolones ont pour cible, une enzyme bactérienne qui assure le maintien du surenroulement de l'hélice d'ADN : il s'agit de la sous-unité A de l'ADN-gyrase, connue également sous le nom de topoisomérase II. L'inhibition de cette enzyme bactérienne va provoquer l'inhibition de la réplication de l'ADN bactérien, d'où l'effet bactéricide des quinolones. Quant à la sous-unité B des topoisomérases bactériennes, elle est inhibée par action synergique des quinolones avec d'autres antibiotiques.

Cet effet bactéricide s'effectue sur les bactéries en phase de multiplication active et sur les bactéries quiescentes.

Sur le plan morphologique, l'effet bactéricide se traduit par une filamentation des bactéries exposées aux quinolones. (Maur, 1990 a ; Mogenet, Fedida, 1997)

Le mode d'action intracellulaire des quinolones contre la topoisomérase II (ou ADN-gyrase) et la topoisomérase IV se fait par blocage de la synthèse d'ADN et de la croissance cellulaire entraînant ainsi la mort cellulaire qui survient de deux manières :

- Le complexe ADN et DNA-gyrase va subir une séparation par les quinolones avec formation de complexes gyrase-quinolones et de morceaux d'ADN double brin létaux. Cette réaction est réversible car la séparation peut être bloquée par les inhibiteurs de la synthèse d'ARN et de protéines ;
- Les sous-unités de la gyrase vont subir une dissociation avec formation de terminaisons d'ADN double brin létaux. Cette réaction est irréversible car l'effet léthal est insensible aux inhibiteurs de la synthèse de l'ARN et des protéines. (Clifford, 1992 ; Hooper, 2001)

Ces deux mécanismes létaux agissent également sur la topoisomérase IV ; leur mise en évidence chez *Escherichia coli* est difficile car la topoisomérase IV n'est que la cible secondaire des quinolones pour cette bactérie. (Drlica *et al*, 1997)

La DNA-gyrase de *Escherichia coli* est très sensible aux quinolones devenant ainsi leur cible principale. (Clifford, 1992 ; Hooper, 2001)

3.6 INDICATIONS ET CONTRE INDICATIONS THERAPEUTIQUES

3.6.1 INDICATIONS THERAPEUTIQUES

L'indication thérapeutique est fonction de la quinolone employée ; en effet, l'acide nalidixique et l'acide oxolinique sont utilisés dans le traitement des infections urinaires ; quant à la fluméquine, on l'emploie lors d'infections générales aux germes à Gram négatif, et lors d'infections digestives, respiratoires et cutanées à staphylocoques. La fluméquine et l'acide oxolinique sont ainsi très largement employés dans le traitement curatif ou préventif de nombreuses maladies bactériennes affectant différentes espèces animales : salmonelloses ; pasteurelloses ; colibacilloses du veau, des volailles, du porc et des animaux de compagnie ; et vibriose, aéromonose, yersiniose des poissons. (Fontaine et Cadore, 1995 a)

La difloxaciné et l'enrofloxaciné sont indiqués dans les infections respiratoires chroniques à *E. coli* et *Mycoplasma gallisepticum*, et dans d'autres infections causées par *Salmonella typhimurium* et *Haemophilus paragallinarum* chez le poulet et le dindon. (Lecoeur-Bitchatchi et Kolf-Clauw 1999)

L'enrofloxacin et la danofloxacin sont efficaces sur les mycoplasmoses aviaires, les entérites colibacillaires et les salmonelloses. (Prescott *et al*, 1993; Brown, 1996)

3.6.2 CONTRE-INDICATIONS THERAPEUTIQUES

Elles vont dépendre de deux paramètres essentiels : le délais d'attente et les interactions médicamenteuses. En prenant la fluméquine à titre d'exemple, il ne faut pas l'administrer aux poules pondeuses dont les œufs sont destinés à la consommation humaine et ne pas l'associer au triméthoprime-sulfamide. (Bensemmane *et al*, 1995)

3.7 TOXICITE-RESIDUS ET TEMPS D'ATTENTE

3.7.1 TOXICITE

Les quinolones ont montré une très faible toxicité (DL 50 > 2000 mg/kg) chez les animaux de laboratoire. (Fontaine et Cadore, 1995 a)

Les fluoroquinolones ont montré également une très faible toxicité (DL 50 > 5000 mg/kg) chez les animaux de laboratoire. (Vandaele *et al*, 1999)

3.7.2 RESIDUS ET TEMPS D'ATTENTE

Vu la cinétique rapide des quinolones, la persistance des résidus est faible d'où un temps d'attente relativement court. Exemple : 48 h après l'arrêt de l'administration de la fluméquine aux diverses espèces, les résidus sont indétectables d'où un temps d'attente de 48 heures. (Fontaine et Cadore, 1995 a)

Pour les fluoroquinolones tel que l'enrofloxacin, le temps d'attente est beaucoup plus long et va de 10 à 11 jours chez les poulets et les poules et atteint 28 jours chez la dinde. (Meissonnier *et al*, 1995)

3.8 FORMES, VOIES D'ADMINISTRATION ET POSOLOGIE

3.8.1 FORMES ET VOIES D'UTILISATION

Les quinolones se présentent sous formes de comprimés, de pâte orale, de poudre orale, de solution orale et de solution injectable.

La voie la plus utilisée reste la voie orale surtout dans les grands effectifs, soit dans l'eau de boisson ou sous forme d'aliments médicamenteux. Concernant la voie parentérale, ne sont utilisés en médecine vétérinaire que la voie I.M. et la voie S.C. pour la fluméquine en suspensions injectables. (Fontaine et Cadore, 1995 a)

La voie d'administration recommandée pour l'enrofloxacin chez les volailles est généralement la dilution dans l'eau de boisson, à des concentrations de 50 ppm (ce qui revient à des doses comprises entre 8 et 10 mg/kg/j). (Prescott *et al*, 1993)

3.8.2 POSOLOGIE

Les posologies recommandées chez les diverses espèces animales dépendent de la quinolone utilisée : pour l'acide nalidixique, la posologie est de 10 à 30 mg/kg/j en 2 prises, pendant 3 à 4 jours chez le veau, l'agneau et le porc, quant à la danofloxacin, elle est de 5mg/kg/j pendant 3 jours chez la volailles. Concernant la fluméquine, la posologie variera avec l'espèce animale (cf. tableau 3). (Fontaine et Cadore, 1995 a ; Nakamura, 1995)

Tableau 3: Posologies recommandées chez diverses espèces animales pour la fluméquine.

(Fontaine et Cadore, 1995 a)

Animaux domestiques	Traitement curatif (mg/kg)	Traitement préventif (mg/kg)
Bovins :- veaux	12	6
- adultes	6	
Ovins et Caprins	12	
Porcins : - porcelets	30	
- adultes	15	
Volailles	9	
Lapins	30	
Poissons	12	
Chiens et Chats	15	

3.9 MECANISMES DE RESISTANCE AUX QUINOLONNES

La résistance aux antibiotique (ou antibiorésistance) correspond à l'absence ou diminution de la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique.

On distingue deux sortes de résistances : d'une part, on a la résistance naturelle (ou intrinsèque), affectant tous les individus de toutes les souches (non comprises dans le spectre d'action) et présente avant tout contact avec l'antibiotique ; elle est liée à une imperméabilité de la membrane externe et à une faible affinité pour l'ADN-gyrase ; D'autre part, on a la résistance acquise (ou extrinsèque) qui affecte une population bactérienne initialement sensible et devenant résistante après contact avec l'antibiotique. (Puyt, 1992 ; Mogenet et Fedida, 1997)

Les mécanismes de résistance acquise sont typiquement chromosomiques, cependant, l'existence d'une éventuelle résistance acquise de type plasmidique est à envisager. (Boothe, 1994)

L'émergence de résistance aux quinolones chez toutes les espèces bactériennes a été reconnue après l'introduction de ces molécules en thérapeutique. (E.M.E.A., 1999)

Les résistances bactériennes sont exclusivement chromosomiques par mutations. Ces dernières sont dues à : une altération de l'ADN-gyrase ou une imperméabilité de la paroi bactérienne par modification de ses porines. Ces résistances chromosomiques sont codées par 4 gènes : Nal A (résistance de haut niveau), Nal B (résistance de bas niveau), Nal C (diminution de la synthèse de l'ADN par mutation de l'ADN-gyrase), Nal D (diminution de la perméabilité de la membrane bactérienne à l'acide nalidixique). (Courvalin *et al*, 1989 ; Maur, 1990 a)

La possibilité d'une transmission de la résistance aux fluoroquinolones des oiseaux à l'homme est mise en évidence par la découverte de ces gènes de résistance dans la viande de volailles destinée à la consommation humaine. (Van den Bogaard *et al.*, 2001 ; Johnson *et al.*, 2003)

3.9.1 LES RESISTANCES INTRINSEQUES (NATURELLES)

Les résistances intrinsèques sont liées à la capacité des quinolones à traverser la paroi bactérienne ou à l'affinité entre quinolone et topoisomérase II. Le développement des quinolones a permis la synthèse de molécules de plus en plus performantes offrant un spectre d'action de plus en plus large selon les générations de quinolones. (Puyt, 1992 ; Mogenet et Fedida, 1997)

3.9.2 LES RESISTANCES EXTRINSEQUES (ACQUISES)

La résistance extrinsèque aux quinolones est à caractère chromosomique par sélection de mutants préexistants. Les enzymes cibles, suite à une mutation, deviennent insensibles à l'action inhibitrice des quinolones.

Cette résistance dépend de l'espèce bactérienne étudiée et de certains paramètres de la molécule d'antibiotique administrée (nature, durée et concentration de la quinolone administrée). (Brown, 1996 ; Mogenet et Fedida, 1997)

3.9.2.1 Modification de la DNA-gyrase

Ces mutations affectent principalement le gène *gyrA* et le gène *gyrB* codant pour les sous-unités A et B de la DNA-gyrase.

L'analyse séquentielle de l'ADN bactérien montre que les mutations entraînant une résistance concernent fréquemment les acides aminés proche du site de fixation de la sous-unité gyrA (Tyr122 chez *Escherichia coli*). Cette région est nommée QRDR ; c'est la région déterminante pour la résistance aux quinolones. (Yoshida *et al*, 1990)

Les mutations de gyrB conférant un haut niveau de résistance, sont situés dans une région spécifique : Asp246 et Lys447 du gène GyrB chez *Escherichia coli*. (Yamagishi *et al*, 1986)

Selon l'explication apportée par Nicole Moreau dans sa conclusion : « La gyrase est réellement la cible dont la perturbation par les quinolones conduit à la mort cellulaire ; mais l'action des quinolones n'est pas strictement équivalente à l'inactivation de la gyrase, et la simple inhibition de l'activité de surenroulement n'explique pas l'inhibition de la synthèse de l'ADN. Celle-ci vient de la formation de complexes quinolones-gyrase-ADN qui bloquent la fourche de réplication et/ou le mouvement de l'ADN, donc de sa synthèse. Par ailleurs, ces complexes conduisent à la création de coupures des deux brins de l'ADN. A ce moment, une séparation des brins se produit et l'ADN simple brin ainsi libéré agit comme un signal induisant le système SOS. Ce système a divers effets physiologiques dont l'arrêt de la respiration et de la division qui vont conduire à la mort de la cellule. On comprend ainsi plusieurs points qui paraissaient obscurs : le besoin d'une synthèse efficace d'ARN et de protéines puisque la mort résulte d'un processus actif et le fait que les doses inhibant l'activité de surenroulement de la gyrase soient beaucoup plus élevées que les CMI ou les CMB car ce n'est pas l'inhibition du surenroulement qui est nécessaire ; il suffit que de faibles quantités de quinolones produisent quelques coupures dans l'ADN pour que le processus SOS finalement létal se mette en route ». (Moreau, 1991)

3.9.2.2 Modification de la topoisomérase IV

Les mutations concernent également les gènes parC et parE codant pour les sous-unités C et E de la topoisomérase IV. (Khodursky *et al*, 1995)

Chez *Escherichia coli*, la DNA-gyrase est la cible principale des quinolones alors que la topoisomérase IV en est la cible secondaire ; ainsi une mutation entraînant une résistance sur l'une des sous-unités de la topoisomérase IV est moins détectable que sur celles de la DNA-gyrase. (Hooper, 2001)

3.9.2.3 Autres mécanismes de la résistance

La résistance aux quinolones résulte de mutations chromosomiques, cependant des études ont montrées des résistances à caractère plasmidique.

La résistance plasmidique

Selon Jacoby *et al* (1998), une résistance aux quinolones est codée par un gène (qnr) porté par un plasmide de multirésistance isolé sur une *Klebsielle*. Le transfert de ce plasmide par conjugaison, augmente la CMI de la ciprofloxacine de 0.008 à 0.25µg/ml chez *Escherichia coli*. La présence de ce plasmide favorise l'augmentation du niveau de résistance par mutation chromosomique. (Martinez- Martinez *et al*, 1998)

On distingue également deux autres types de mécanismes permettant aux bactéries de diminuer l'accumulation des quinolones dans leur cellule et faisant suite aux mutations responsables des modifications de transport et de passage transmembranaire ; on aura donc : soit une diminution de la perméabilité membranaire (diminution de la pénétration des quinolones), soit un transport actif de ces derniers hors de la cellule (augmentation de l'expulsion des quinolones) ou effet d'efflux. (George and Fagerberg, 1984 ; Cohen *et al*, 1988 ; Hooper, 1995 ; Tillotson *et al*, 1997)

La diminution de la pénétration

E. coli est une bactérie dont la paroi, représentée par une membrane externe de Lipopolysaccharides, présente deux porines majeures de diffusion générale: OmpF et OmpC. Pour que les quinolones puissent franchir cette barrière pour atteindre leur cibles spécifiques (la topoisomérase II et la topoisomérase IV), ils doivent empreinter l'un des deux passages majoritaires représenté par l' OmpF (porine de grande taille). (Cohen *et al*, 1988)

Une déficience de ces porines chez certaines souches bactériennes, suite à des mutations, va engendrer une diminution la pénétration des quinolones et donc une augmentation de la résistance. (Tillotson *et al*, 1997)

L'augmentation de l'expulsion

Le mécanisme de résistance consiste en un transport actif qui correspond à un efflux hors de la bactérie des quinolones ayant pénétré son milieu intracellulaire.

Les systèmes d'efflux, tel que le système acrAE et envCD chez *Escherichia coli*, sont des loci qui, après mutation, sont capables d'expulser les quinolones ; et plus l'expression de ce système est augmentée (surtout chez les mutants), plus la résistance augmente. (Hooper, 1995)

3.9.2.4 Expression de la résistance

Il existe des résistances croisées, totale (quinolones de première génération entre elles), et partielle (quinolones de première génération avec celles de deuxième et troisième génération) : les souches résistantes aux quinolones de première génération ne sont sensibles aux fluoroquinolones qu'à des CMI plus élevés que les souches sensibles. (Maur, 1990 a)

La résistance croisée avec d'autres antibiotiques existe d'autant que « la résistance multiple » est particulièrement fréquente chez *Escherichia coli*. Elle peut provenir soit d'une mutation génétique des porines, soit de l'acquisition de plasmides de résistance. (Entdz *et al.*, 1991)

Un fort taux d'antibiorésistance fut observé sur les nouvelles molécules de fluoroquinolones (Flumequine, Ofloxacin, Norfloxacin, Pefloxacin et Ciprofloxacin) et peuvent causer des résistances croisées avec les agents pathogènes humains. (Blanco *et al.*, 1997)

Hormis cette résistance multiple, la résistance aux quinolones semble connaître une recrudescence importante depuis l'introduction de l'enrofloxacin en médecine aviaire, en effet, selon une étude faite en 1987 aux Pays-Bas, lors de la lutte contre des infections provoquées par *Escherichia coli* et *Mycoplasma spp.*, l'enrofloxacin semble être probablement à l'origine de cette recrudescence de souches résistantes aux fluoroquinolones alors qu'elles étaient quasiment toutes sensibles dans les années précédentes. (Entdz *et al.*, 1991)

L'étude visant à analyser l'impacte d'un traitement oral aux quinolones (Fluméquine et Enrofloxacin) sur l'émergence de souches résistantes d'*Escherichia coli* dans la flore fécale du poulet de chair, tente de mettre en évidence les souches concernées par cette antibiorésistance et d'expliquer les raisons de leur apparition.

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de cette étude est, dans un premier temps, de comparer l'efficacité thérapeutique de deux anti-infectieux en l'occurrence deux quinolones (administrés par voie orale via l'eau de boisson en 2 modes différents) dans le traitement d'une colibacillose aviaire expérimentale, puis dans un deuxième temps, de rechercher l'émergence d'antibiorésistance aux anti-infectieux utilisés dans la flore colibacillaire des animaux traités, et enfin le troisième objectif est de répondre aux questions suivantes :

➤ Quelle est la relation entre le traitement per os et la résistance des souches d'*E. coli* (expliquer cette résistance par rapport au mode d'administration de l'antibiotique dans l'eau de boisson) ?

➤ Quelles sont les souches d'*E. coli* résistantes à l'antibiotique (déterminer le type de souches d'*E. coli* : pathogène et/ou saprophyte) ?

➤ Quels sont les facteurs influençant, responsables de cette antibiorésistance ?

➤ Quel est le moyen d'éviter cette antibiorésistance chez le poulet de chair ?

Ces résultats permettront de définir le schéma thérapeutique le plus adapté pour la fluméquine dans le traitement de la colibacillose aviaire.

2. GENERALITES

2.1 APPROCHE EXPERIMENTALE

Pour le bon déroulement du protocole expérimental, deux approches simultanées sont envisagées et l'étude est réalisée à deux niveaux : Bâtiment d'élevage et Service de Bactériologie. L'étude est donc divisée en deux parties :

Première partie : Reproduction et traitement d'une colibacillose aviaire sur un élevage expérimental de poulet de chair (au niveau d'un Bâtiment d'élevage)

On réalise ce qui suit:

- Inoculation de la O78:K80 (souche très pathogène d'*E. coli*),
- Traitement à la fluméquine et à l'enrofloxacin (deux quinolones),
- Prélèvements journaliers de la flore fécale (avant, pendant et après inoculation et traitement).

Deuxième partie : Recherche des souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones après administration de deux molécules thérapeutiques (au niveau du Service de Bactériologie du CHU de Constantine).

A la réception des prélèvements provenant de l'élevage expérimental, on procède à :

- L'Identification de la flore fécale du poulet de chair par la galerie biochimique,
- La Recherche, identification et isolement des souches d'*E. coli* par la galerie biochimique,
- La Recherche de la souche d'*E. coli* inoculée (la O78) par le sérotypage,
- La Recherche de la résistance des souches d'*E. coli* (O78 et saprophyte) par l'antibiogramme.

2.2 ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le protocole expérimental se déroule en 06 étapes :

- 1^{ère} étape: Etude de la souche pathogène *E.coli* O78 (Profil numérique, sérotypage et antibiogramme in vitro),
- 2^{ème} étape: Préparation de l'inoculum (*E. coli* O78),
- 3^{ème} étape: Inoculation d'une souche pathogène d'*E.coli* (O78),
- 4^{ème} étape: Administration de la fluméquine et de l'enrofloxacin,
- 5^{ème} étape: Prélèvement de la flore fécale pendant toute la période du protocole expérimental (avant, pendant et après inoculation et traitement),
- 6^{ème} étape: Recherche et identification des souches résistantes d'*E. coli*.

En ce qui concerne le lieu de leur déroulement :

- Les deux premières étapes et la dernière étape sont réalisées au niveau du Service de Bactériologie (Etude – Préparation - Recherche et identification).
- Les trois autres étapes sont réalisées au niveau de l'élevage expérimental (Inoculation - Administration - Prélèvement).

Chaque étape de ce protocole expérimental nécessite un matériel et une méthode bien précise.

MATERIELS ET METHODES

AU NIVEAU DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL

1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1.1 LES ANIMAUX

L'étude portait sur 101 poulets de chair, de souche ISA 15 (à plumes Blanches) et de souche inconnue (à plumes Tachetées), âgés de 1 jour à leur arrivée dans le bâtiment d'élevage. Après 21 jours (âge d'entrée dans l'essai expérimentale), on ne comptait plus que 66 poulets (dont 63 sujets repartis en 6 lots et 4 groupes et 3 sujets réservés pour le test d'inoculation) avec un poids corporel moyen de 0.168 kg/sujet, une consommation moyenne d'aliment de 0.02 kg/sujet et une consommation moyenne d'eau de 0.06 L/sujet.

1.2 HEBERGEMENT DES ANIMAUX

Il s'agit d'un bâtiment d'élevage situé sur une colline, au milieu d'un verger dans la Commune de Hamma-Bouziane (Wilaya de Constantine). Les oiseaux étaient élevés sur une litière de copeaux de bois, et soumis à un éclairage naturel et une ventilation statique. Des trémies et abreuvoirs siphoniques en nombre approprié complétaient le matériel d'élevage. L'eau et l'aliment étaient distribués tous les matins à une heure fixe (à 8 heures) après avoir subi une double pesée (une pesée avant la distribution et une pesée 24 heures après, pour évaluer la consommation journalière en eau et aliment).

1.3 REPARTITION DES ANIMAUX

Au départ, la répartition des animaux (dès leur entrée dans l'essai expérimental) était envisagée selon la figure suivante (cf. Figure 13):

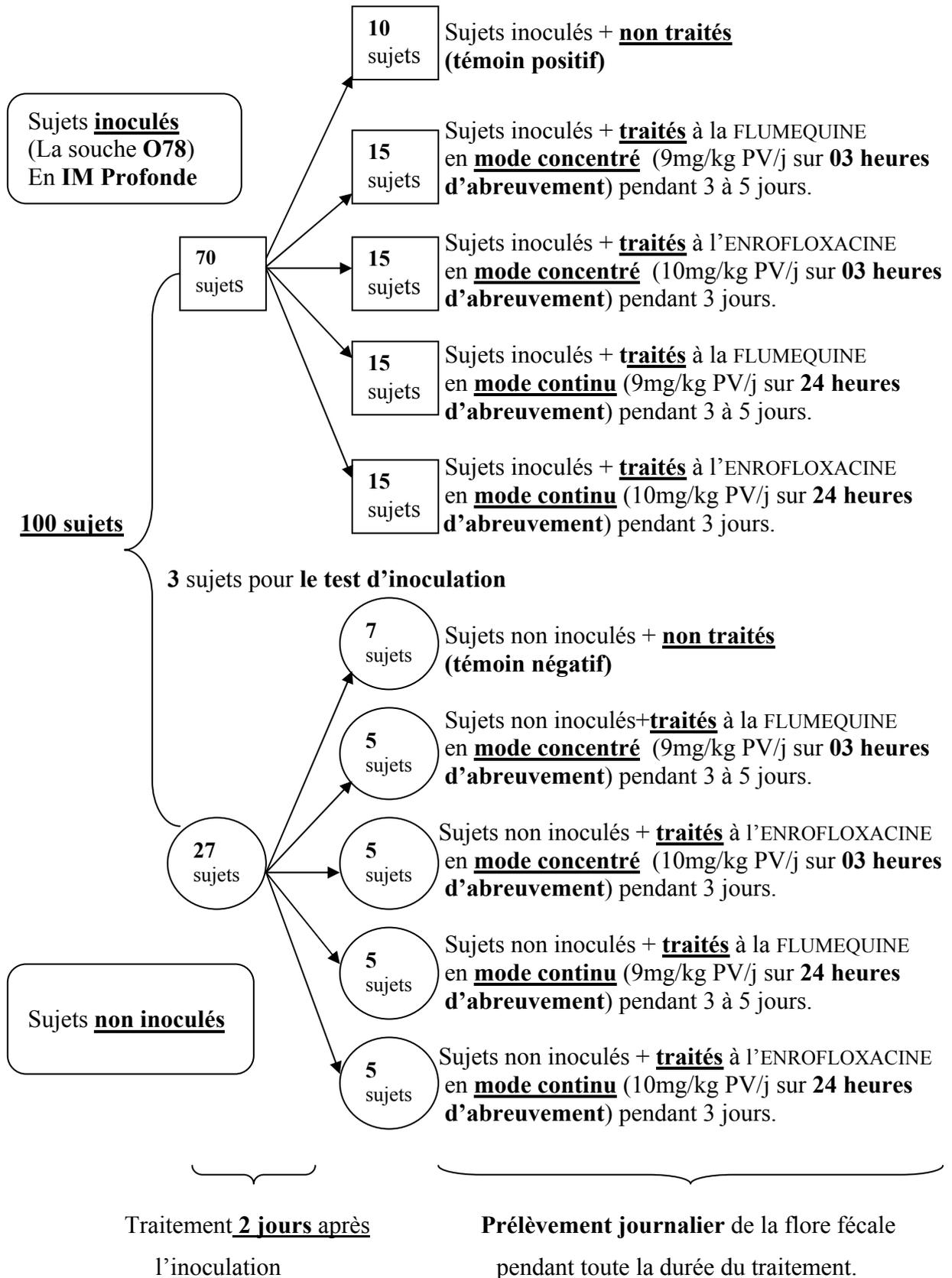


Figure 13 : Première Répartition Des Animaux
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

Vu le nombre important de mortalité recensée (35 sujets sur un total de 101 sujets) avant le protocole expérimental, suite à la canicule, une seconde répartition des animaux fut adoptée :

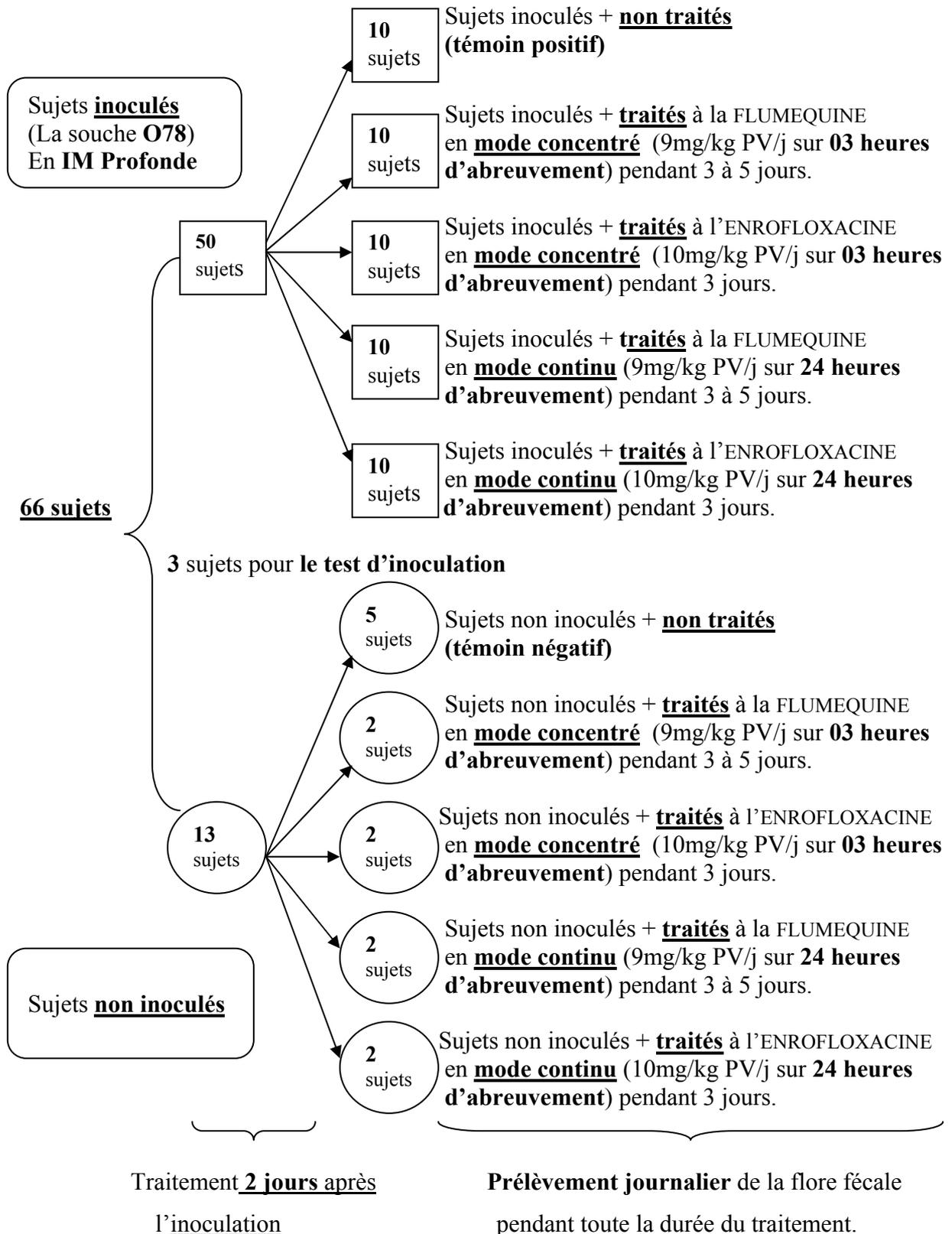


Figure 14 : Deuxième Répartition Des Animaux
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

Les poulets ont donc été répartis en 6 lots et 4 groupes dans le bâtiment d'élevage (cf. Figure 15: Répartition Des Oiseaux en 6 Lots et 4 Groupes) et pour chaque lot et groupe, on comptait le nombre de sujets suivants :

Lot 1 : 10 poulets **inoculés** (par voie I.M. avec 0,1 ml de suspension pathogène d'*E.coli*), mais **non traités** servant de témoins positifs (pour évaluer les effets de l'inoculum et des traitements administrés).

Lot 2 : 5 poulets **non inoculés, non traités** servant de témoins négatifs (pour évaluer l'état sanitaire des oiseaux).

Lot 3 : 10 poulets **inoculés** (par voie I.M. avec 0,1 ml de suspension pathogène d'*E.coli*), puis **traités** avec l'ENROFLOXACINE dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur **3 heures d'abreuvement** pendant 3 jours.

Lot 4 : 10 poulets **inoculés** (par voie I.M. avec 0,1 ml de suspension pathogène d'*E.coli*), puis **traités** avec l'ENROFLOXACINE dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur **24 heures d'abreuvement** pendant 3 jours.

Lot 5 : 10 poulets **inoculés** (par voie I.M. avec 0,1 ml de suspension pathogène d'*E.coli*), puis **traités** avec la FLUMEQUINE dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur **3 heures d'abreuvement** pendant 3 à 5 jours.

Lot 6 : 10 poulets **inoculés** (par voie I.M. avec 0,1 ml de suspension pathogène d'*E.coli*), puis **traités** avec la FLUMEQUINE dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur **24 heures d'abreuvement** pendant 3 à 5 jours.

Groupe 1 : 2 poulets **non inoculés, traités** avec la FLUMEQUINE dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur **3 heures d'abreuvement** pendant 3 à 5 jours.

Groupe 2 : 2 poulets **non inoculés, traités** avec la FLUMEQUINE dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur **24 heures d'abreuvement** pendant 3 à 5 jours.

Groupe 3 : 2 poulets **non inoculés, traités** avec l'ENROFLOXACINE dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur **3 heures d'abreuvement** pendant 3 jours.

Groupe 4 : 2 poulets **non inoculés, traités** avec l'ENROFLOXACINE dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur **24 heures d'abreuvement** pendant 3 jours.

N.B. : Selon le nombre de sujets, on attribut le terme de « Lot » aux sujets regroupés par 5 ou 10 et celui de « Groupe » aux sujets regroupés par 2. De plus, tous les sujets non inoculés servent de témoin aux sujets inoculés.

La durée du traitement à la FLUMEQUINE va de 3 à 5 jours selon l'évolution de la colibacillose aviaire expérimentale ; Quant à l'ENROFLOXACINE, elle est de 3 jours seulement lors d'une colibacillose, et de 5 jours dans le cas d'une salmonellose.

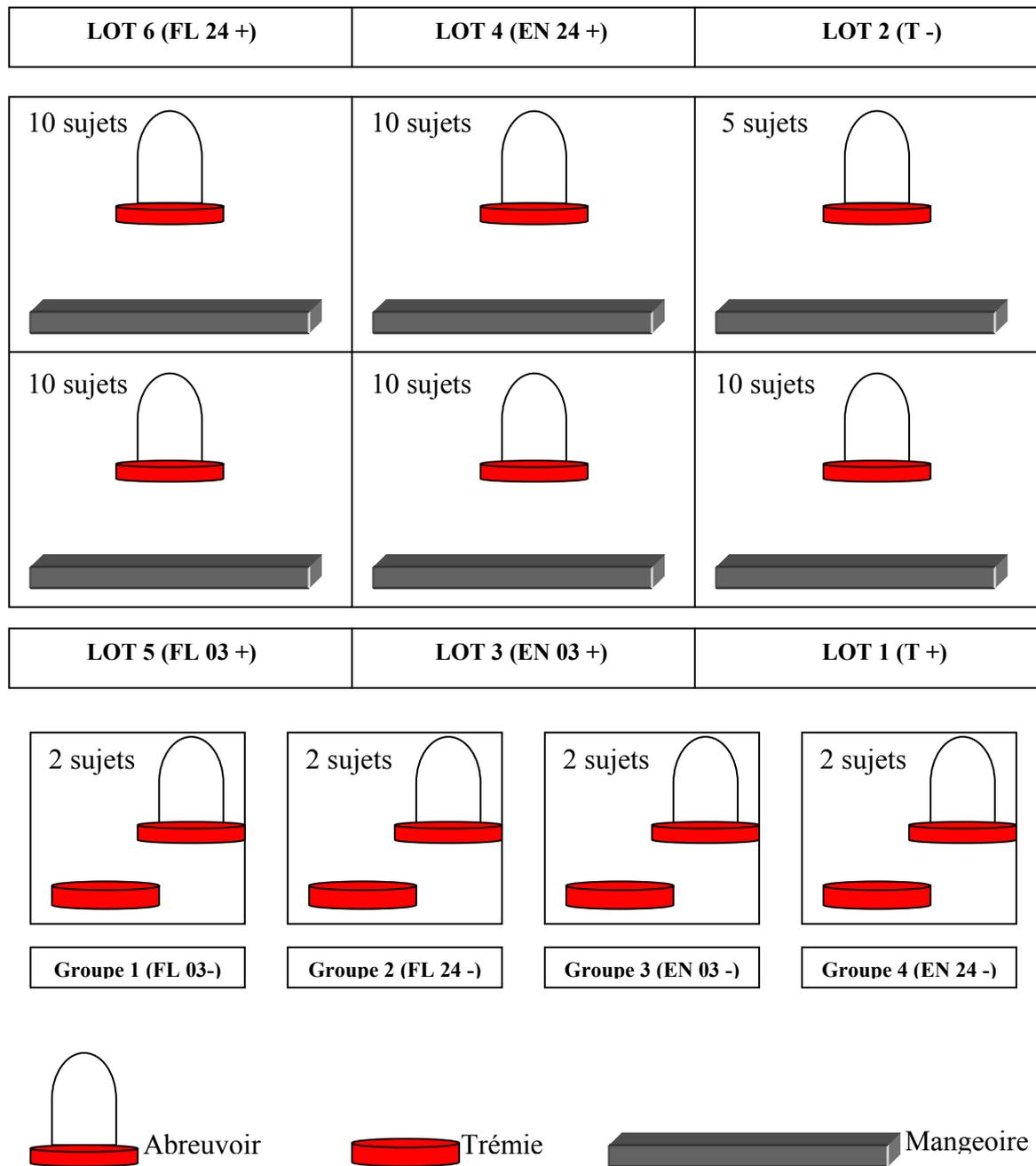


Figure 15: Répartition Des Oiseaux En 6 Lots Et 4 Groupes

Dans cette seconde répartition, la disposition des lots et des groupes n'est pas faite au hasard ; en effet, tous les sujets inoculés et non inoculés sont séparés (pour une étude comparative) à l'exception du lot 2 (témoin négatif) qui est mis avec les sujets inoculés afin de mettre en évidence une éventuelle contamination par l'agent pathogène inoculé. De plus, et pour un accès et une manipulation faciles, les lots traités sur 3 heures d'abreuvement sont placés en avant.

1.4 LES PRELEVEMENTS

Des prélèvements de matières fécales sont effectués quotidiennement sur un sujet pris au hasard dans chacun des six lots et quatre groupes à une heure fixe (4 heures après administration du traitement per os) et ce pendant toute la durée de l'expérimentation suivant la répartition indiquée dans la Figure 15.

1.4.1 Réalisation des prélèvements de fientes

Un prélèvement par sujet (pris au hasard) par lot ou groupe est effectué à l'aide d'un écouvillon stérile, trempé dans une solution d'eau distillée (pour humidifier l'écouvillon et faciliter ainsi sa manipulation) avant de l'introduire dans le cloaque pour un prélèvement de la flore fécale.

Le sujet est saisi d'une main, et à l'aide du pouce et de l'index, la région cloacale est découverte pour faciliter l'introduction de l'écouvillon. Une fois le prélèvement effectué, l'écouvillon est remis soigneusement dans son étui avant d'être emmené au laboratoire de bactériologie.

Vu l'hétérogénéité des oiseaux par la présence de deux souches animales : la ISA 15 à plumes blanches et la souche inconnue à plumes tachetées ; les prélèvements du jour sont effectués sur une seule souche animale, à un jour d'intervalle entre chacune. (cf. Annexe 6)

Lors de la réalisation des prélèvements, on débute toujours par les sujets non inoculés pour éviter toute contamination possible.

1.4.2 Identification des prélèvements

Une dizaine de prélèvements par jours (un prélèvement par lot et groupe) sont effectués à l'aide d'écouvillons préalablement marqués du code suivant : la date / le nom de l'antibiotique / le mode d'administration / l'inoculation / (la date du protocole expérimental) pour les sujets traités. Ex : 15-08-05, FL / 24 / + (J2) ce qui correspond au : 15-08-05, sujets traités à la

Fluméquine / sur 24 h / sujets inoculés (2 jour après l'inoculation). Concernant les sujets non traités ou Témoins, on inscrit : la date / sujets témoins / l'inoculation / (la date du protocole expérimental). Ex : 16-08-05, T / - (J3) qui correspond au : 16-08-05, sujets Témoin / sujets non inoculés (3 jour après l'inoculation).

Pour les souches animales, il est inutile de les préciser sur l'écouvillon car du moment où l'on débute avec une souche, il suffit par la suite de faire le décompte pour retrouver les dates de prélèvement de chacune d'entre elles, et par conséquent, de reconnaître la souche animale. (cf. Annexe 6)

1.5 INOCULATION D'*ESCHERICHIA COLI* (O78:K80)

L'inoculation d'une souche pathogène permet de reproduire une colibacillose aviaire expérimentale sur laquelle on étudiera les deux molécules de quinolones.

1.5.1 Souche d'*Escherichia coli*

De sérotype O78:K80, la souche bactérienne est choisie parmi une collection de souches pathogènes d'*Escherichia coli*, pour sa virulence et sa sensibilité à la fluméquine. Ses CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et CMB (Concentration Minimale Bactéricide) sont respectivement 0,5 et 4µg/ml pour la fluméquine.

Cette souche nous a été donnée à titre gracieux par le Laboratoire Vétérinaire Régional de Constantine ; elle nous a été remise dans une boîte de Pétri (sous forme de culture pure de *E. coli* O78:K80) sur milieu Héктоen.

Du fait de la virulence de la souche bactérienne, l'inoculum est préparé à une dose qui est sensée provoquer un taux de mortalité inférieur à 50% en quelques jours.

L'inoculum est préparé le jour même de son utilisation, par dilution en milieu PBS de la suspension mère (suspension bactérienne), (selon le milieu utilisé par Arp, 1985 et Mogenet *et al.*, 1997).

L'inoculation est réalisée à J0, par injection intramusculaire profonde dans les muscles du bréchet, d'une dose diluée à 1/5 d'*E. coli* dans un volume de 0,1 ml, (selon le protocole d'inoculation réalisé par Mogenet *et al.*, 1997 et les résultats obtenus lors de l'inoculum d'essai).

1.5.2 L'inoculum

Avant d'injecter l'inoculum final, des tests d'inoculation sont effectués en préparant un inoculum d'essai à différentes dilutions pour retrouver la dose qui est sensée provoquer un taux

de mortalité inférieur à 50% en quelques jours. C'est sur la base des résultats obtenus lors de l'inoculum d'essai que l'on prépare l'inoculum final. (cf. Annexe 3 et Figure 21)

1.5.2.1 L'inoculum d'essai:

- Préparation de la suspension pathogène : Elle se fait à partir d'une culture pure de O78. (Voir dans Méthodes : les manipulations pour la préparation de l'inoculum).
- Doses inoculées: doses diluées à 1/2 (50%), 1/5 (20%) et 1/10 (10%) dans un volume de 0.1 ml chacune.
- Nombre de poulets à inoculer : 3 poulets recevant chacun une seule dose (une dilution par poulet) dans un volume de 0.1 ml.
- Volume total de chaque dilution: prévoir 5 ml (au minimum) pour en faciliter la lecture par le spectrophotomètre. Agiter pendant quelques secondes le volume total de chaque dilution avant la lecture, pour bien homogénéiser la suspension bactérienne et obtenir ainsi une densité optique (D.O.) exacte qui nous permettra de reproduire l'une des trois suspensions servant d'inoculum final. La lecture se fera à une longueur d'onde de 625 nm.
- Le volume final : prélever 0.1ml de chaque dilution pour le test d'inoculation (chaque dilution est inoculée à un seul sujet).
- Jour du test d'inoculation : J-4 (4 jours avant la date de l'inoculation pour pouvoir définir la dilution ou la dose qui est sensée provoquer un taux de mortalité inférieur à 50% en quelques jours).

1.5.2.2 L'inoculum final:

- Préparation de la suspension pathogène : Elle se fait à partir d'une culture pure de O78. (Voir dans Méthodes: les manipulations pour la préparation de l'inoculum).
- Dose inoculée: Dose diluée à 1/5 (20%) dans un volume de 0.1 ml.
- Nombre de poulets à inoculer : 50 poulets ce qui équivaut à 50 doses x 0,1 ml = 5 ml.
- Volume total : Par mesure de sécurité, on prépare presque 100 doses ce qui correspond à 10 ml environs.
- Le volume final : inoculer 0.1 ml de l'inoculum final à chaque sujet.
- Jour de l'inoculation : J0.

1.6 CRITERES D'ETUDE DU PROTOCOLE THERAPEUTIQUE (TRAITEMENT)

Avant d'entamer le protocole thérapeutique, et pour conduire l'élevage expérimental dans les meilleurs conditions possibles jusqu'au jour du protocole expérimental, un protocole de vaccination fut introduit et un complément minéralo-vitaminés fut apporté (VITAL-C dans l'eau de boisson et BELLAVET-G dans l'aliment). La vaccination n'a pas pu se faire suite à la canicule. (cf. Annexe 2)

1.6.1 Produits à l'étude

Pour mieux apprécier l'effet d'un traitement oral à la fluméquine sur des sujets inoculés, un second produit de la même famille que le premier (quinolone) est introduit dans l'essai expérimental ; il s'agit de l'enrofloxacin.

Tableau 4: Produits Utilisés Dans L'étude Expérimentale

PRODUIT 1	PRODUIT 2
D.C.I. : FLUMEQUINE	D.C.I. : ENROFLOXACINE
N.C. : FLUMEQUINE 10 %	N.C. : BAYTRIL® 10%
Présentation : Poudre hydrosoluble pour l'administration par voie orale dans l'eau potable.	Présentation : Solution orale pour volailles.
Conditionnement : Sachet de 100 g	Conditionnement : Flacon de 100 ml
Composition : pour 100 g Fluméquine10g Carbonate de sodium anhydre.....8g Dioxyde de silice.....3g Lactose D20.....79g	Composition : pour 100 ml Enrofloxacin 10g - Hydroxyde de potassium - Alcool benzylique -Méthylhydroxypropyl - Cellulose - Eau purifiée ad 100 ml.
Indications : Affections à germes sensibles à la fluméquine. Agent chimiothérapeutique de haute efficacité pour la prévention et le traitement des maladies infectieuses dues aux bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif : colibacillose , salmonellose, choléra aviaire, pasteurellose, coryza, infections à staphylocoques, etc. Pour volailles, bovins, équins, caprins, ovins.	Indications : Affections infectieuses causées par des bactéries gram négatives et gram positives et les mycoplasmes, particulièrement : les mycoplasmes et infections mixtes à mycoplasmes et bactéries (C.R.D.) ; les coli-septicémies et les coli-polysérosites ; la pasteurellose (choléra) ; le coryza infectieux (haémophilus) ; la pullorose et autres salmonelloses ; la staphylococcose.
Contre-indications : Pas de contre-indications.	Contre-indications : Ne pas administrer aux poules pondeuses dont les œufs sont destinés à la consommation humaine.
Posologie : Dose thérapeutique : 9 mg de Fluméquine par Kg de poids vif par jour	Posologie : Dose thérapeutique : 10 mg d'Enrofloxacin par Kg de poids vif par jour
Durée du traitement : 3 à 5 jours.	Durée du traitement : 3 jours. En cas de salmonellose, le traitement est de 5 jours.

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

Voie d'administration : Dans l'eau de boisson.	Voie d'administration : Dans l'eau de boisson.
Délai d'attente : 2 jours chez le poulet.	Délai d'attente : 9 jours chez le poulet.
Conservation : Tenir dans un endroit frais, à l'abri de la lumière.	Conservation : A température ambiante.
Fabriqué par : Bremer Pharma GMBH, 27540 Bremerhaven, Allemagne.	Fabriqué par : Bayer HealthCare AG, Leverkusen, R.F.A.
Distribué par : ABS PERFORMANCE, Coopérative Amina villa n° 32, Chéraga, Alger, 16000 Algérie.	Distribué par : VETRAL Algérie. Tél / info : 021 68 73 93.
A.M.M. en Algérie: 224.01.2.29.	A.M.M. 142.01.2.03 du 26.05.1991. ® Marque déposée de Bayer AG, Leverkusen, R.F.A.

1.6.2 Schéma du traitement (protocole thérapeutique proprement dit)

Les traitements ont été instaurés dans l'eau de boisson 48 heures après l'inoculation (à J2). La distribution des anti-infectieux a duré 3 jours pour l'Enrofloxacin et 5 jours pour la Fluméquine et s'est donc terminée à J4 pour l'Enrofloxacin et J6 pour la Fluméquine. (cf. Figure 16 et Annexe 5 et 6)

Les différents lots et groupes ont été traités selon le protocole thérapeutique suivant:

Lot 3 : 10 poulets inoculés, puis traités à l'Enrofloxacin « Baytril® 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur 3 heures d'abreuvement pendant 3 jours.

Lot 4 : 10 poulets inoculés, puis traités à l'Enrofloxacin « Baytril® 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur 24 heures d'abreuvement pendant 3 jours.

Lot 5 : 10 poulets inoculés, puis traités à la Fluméquine « Fluméquine 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur 3 heures d'abreuvement pendant 3 à 5 jours.

Lot 6 : 10 poulets inoculés, puis traités à la Fluméquine « Fluméquine 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur 24 heures d'abreuvement pendant 3 à 5 jours.

Groupe 1 : 2 poulets non inoculés, traités à la Fluméquine « Fluméquine 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur 3 heures d'abreuvement pendant 3 à 5 jours.

Groupe 2 : 2 poulets non inoculés, traités à la Fluméquine « Fluméquine 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 9mg/kg de PV/j sur 24 heures d'abreuvement pendant 3 à 5 jours.

Groupe 3 : 2 poulets non inoculés, traités à l'Enrofloxacin « Baytril® 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur 3 heures d'abreuvement pendant 3 jours.

Groupe 4 : 2 poulets non inoculés, traités à l'Enrofloxacin « Baytril® 10% » dans l'eau de boisson à la dose de 10mg/kg de PV/j sur 24 heures d'abreuvement pendant 3 jour.

La pesée de la Fluméquine a été effectuée à l'aide d'une balance de précision +/- 1 gramme, et l'Enrofloxacin a été dosée à l'aide d'une seringue.

Chaque jour aux environs de 8 heures, la quantité de produit nécessaire au traitement a été calculée et ajustée à partir du poids vif des poulets vivants lors de la pesée du jour.

Le volume de la solution médicamenteuse a été ajusté sur la consommation moyenne de l'eau de boisson de la veille du protocole thérapeutique (J1), et ce, pour toute la durée du traitement. (cf. Annexe 5 et 8)

1.6.3 Dose réelle du traitement

La totalité de l'eau médicamenteuse préparée chaque jour n'a pas toujours été consommée en fin de période de traitement. En effet les animaux morts au cours du traitement n'ont pas consommé la quantité d'eau qui leur était destinée.

En tenant compte chaque jour de l'effectif (animaux vivants) et de la quantité d'eau traitée et renouvelée, la posologie réelle par jour a pu être calculée pour chaque produit. Les posologies ainsi calculées sont très proches de la posologie attendue, c'est à dire de 9mg/kg/j pour les sujets traités à la Fluméquine et 10 mg/Kg/j pour les sujets traités à l'Enrofloxacin. (cf. Annexe 5 et 7)

1.7 CRITERES D'ETUDE DU PROTOCOLE CLINIQUE

C'est en se basant sur les critères d'étude utilisés par Mogenet *et al.*, 1997 et en les adaptant à notre étude, qu'on a pu établir les critères principaux suivants :

1.7.1 Croissance des animaux :

La croissance des animaux a été appréciée en pesant l'ensemble des poulets de chaque lot et groupe (à l'aide d'une balance de précision +/- 25 grammes pour les groupes de 2 sujets et d'une balance de précision +/- 100 grammes pour les lots de 10 sujets), de J0 (jour de l'inoculation) à J6 (fin du protocole thérapeutique) ; ce critère témoigne de l'état de santé des animaux. (cf. Annexe 4 et 5)

1.7.2 Consommation d'eau et d'aliment:

La consommation d'eau est corrélée à la consommation alimentaire ; elle reflète par l'appétit, l'état de santé des animaux. (cf. Annexe 1, 4 et 5)

1.7.3 Morbidité :

La morbidité a été observée quotidiennement, de J0 à J8, et fut appréciée par le symptôme de la prostration inclus dans la notation du score symptomatique. Comme l'a décrit Mogenet *et al.*, 1997, la prostration est caractérisée par une attitude ramassée, somnolente avec plumes ébouriffées. (cf. Annexe 9)

1.7.4 Score symptomatique

L'ensemble des symptômes observés de J-4 à J8, fut enregistré selon la notation suivante :

Tableau 5: Classification Des Symptômes Observés Chez Des Poulets De Chair Atteints De Colibacillose Expérimentale.

Notes	Symptômes observés
0	Poulet normal ;
1	Poulet prostré, debout ou couché, se déplaçant facilement à la sollicitation ;
2	Poulet prostré, couché, se déplaçant difficilement à la sollicitation ;
3	Poulet prostré, couché, ne se déplaçant pas à la sollicitation ;
4	Poulet prostré, couché, présentant un port anormal de la tête ;
5	Poulet prostré, couché, présentant des convulsions.

(cf. Annexe 9)

1.7.5 Mortalité

Le nombre de poulets morts a été relevé pendant toute la période de l'élevage expérimental (depuis leur arrivée à 1 jour, jusqu'à la fin de l'élevage à 38 jours, ce qui correspond en terme d'élevage, aux périodes de démarrage et de croissance, et en terme scientifique, aux périodes d'acclimatation et d'inoculation). A partir de l'entrée dans l'essai expérimental (21 jours), la mortalité a été relevée deux fois par jour (matin et soir) dans chaque lot et groupe. (cf. Annexe 3, 5, 11 et 12)

1.7.6 Score lésionnel

Le score lésionnel ainsi que les lésions (et selon la souche animale) ont été notés pour tous les sujets morts au cours de l'essai (J-4 à J8) et pour tous les sujets sacrifiés à J8, selon la classification suivante :

Tableau 6 : Classification Des Lésions Observées Chez Des Poulets De Chair Atteints De Colibacillose Expérimentale.

Notes	Lésions observées
0	Etat normal ;
1	Viscères abdominaux légèrement congestionnés et d'aspect brillant (Ascite) ;
2	Congestion importante du foie ;
3	Congestion importante du foie et de la rate ;
4	Congestion importante du foie, de la rate et des reins ;
5	Congestion hépatique importante avec hypertrophie et dépôt fibrineux épais recouvrant le foie ;
6	Congestion rénale importante avec dépôt d'urates (uretères blanchâtres).

(cf. Annexe 10, 12, 13, 14 et 15)

Tous ces critères d'études sont récoltés pour établir une base de données sur le protocole clinique et thérapeutique. (cf. Annexes)

2. CHOIX DES PARAMETRES DU PROTOCOL EXPERIMENTAL.

2.1 CHOIX DE L'ECHANTILLON

2.1.1 La souche animale

Elle dépend des couvoirs (Bande homogène ou non). Concernant l'élevage expérimental, nous avons constaté la présence de deux souches animales : la ISA 15 (à plumes blanches) et une souche Inconnue (à plumes tachetées).

2.1.2 L'effectif (le nombre)

Suite à la canicule, soixante six sujets ont été répartis, le jour de l'essai expérimental, en trois sujets réservés à l'essai expérimental (inoculés et non traités) et soixante trois sujets inoculés et non inoculés comprenant : un lot témoin négatif (non inoculés et non traités), un lot témoin positif (inoculés et non traités) et des lots inoculés et traités et non inoculés et traités, selon 02 modes (concentré et continu), avec 02 antibactériens de la famille des quinolones. (cf.

Figure 16)

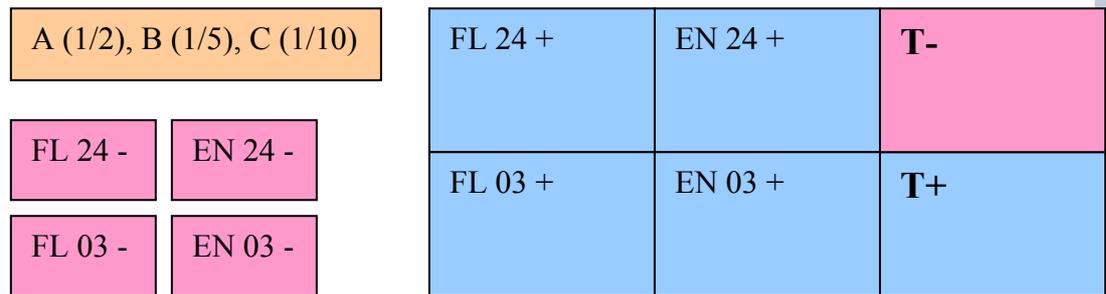


Figure 16: Schéma Du Protocole Expérimental

Légende :

Sujets de l'essai expérimental

Sujets inoculés

Sujets non inoculés

T Sujets non traités (Témoins)

A (1/2)	Sujet recevant l' inoculum d'essai dilué à 1/2
B (1/5)	Sujet recevant l' inoculum d'essai dilué à 1/5
C (1/10)	Sujet recevant l' inoculum d'essai dilué à 1/10
T +	Témoin Positif : Sujets inoculés et non traités
FL 03 +	Sujets inoculés et traités à la Fluméquine à dose concentrée (3 h) pendant 5 jours
FL 24 +	Sujets inoculés et traités à la Flumequine à dose continue (24 h) pendant 5 jours
EN 03 +	Sujets inoculés et traités à l' Enrofloxacin e à dose concentrée (3 h) pendant 3 jours
EN 24 +	Sujets inoculés et traités à l' Enrofloxacin e à dose continue (24 h) pendant 3 jours
T -	Témoin Négatif : Sujets non inoculés et non traités
FL 03 -	Sujets non inoculés et traités à la Flumequine à dose concentrée (3 h) pendant 5 jours
FL 24 -	Sujets non inoculés et traités à la Flumequine à dose continue (24 h) pendant 5 jours
EN 03 -	Sujets non inoculés et traités à l' Enrofloxacin e à dose concentrée (3 h) pendant 3 jours
EN 24 -	Sujets non inoculés et traités à l' Enrofloxacin e à dose continue (24 h) pendant 3 jours

2.1.3 Le sexe et l'âge

Les mâles sont plus réceptifs que les femelles à la colibacillose ; il en est de même pour les sujets jeunes par rapport aux adultes ; c'est pour ces deux raisons que le choix s'est porté sur des poulets de chair âgés de 21 jours environs à l'entrée du protocole expérimental.

Selon Turqi, 2000, il existe des facteurs influençant l'apparition de la colibacillose que l'on résume dans le tableau suivant :

Tableau 7: Facteurs Influençant L'apparition De La Colibacillose Aviaire.

Facteurs Augmentant L'apparition De La Pathologie	Facteurs Diminuant L'apparition De La Pathologie
Les Agents pathogènes: bactéries, virus, champignons et toxines.	Le système immunitaire: immunité passive ou acquise (vaccins).
Les facteurs physiologiques: âge=jeunes, sexe=mâle, stress.	Les facteurs physiologiques: âge=adultes, sexe=femelle, génétique, flore intestinale naturelle.
L'environnement: eau, aliments, litière, aération, température et densité non conformes aux normes d'élevage.	L'alimentation: aliment riche en protéines, en fer et en vitamines (A, B, C).

(Turqi, 2000)

2.2 CHOIX DE LA SOUCHE PATHOGENE ET DE SON INOCULATION

2.2.1 La souche bactérienne

Il s'agit de la **O78:K80**, choisi parmi une collection de souches pathogènes sur le terrain, pour sa sensibilité à la Fluméquine et son expression paraclinique spectaculaire (lésions de colisépticémie), comme le montre le tableau suivant :

Tableau 8: Quelques Sérotypes D'*Escherichia coli* Et Leur Spécificités.

Sérotypes D' <i>Escherichia coli</i>	Spécificités
O15	SYNOVITE (spécificité pour une expression clinique particulière)
O78:K80	COLISEPTICEMIE (spécificité pour une expression paraclinique particulière)
O109	AEROSACCULITE (spécificité pour une expression clinique particulière)
O86	CANARD (spécificité d'espèce)

(Arp, 1982 ; Lecoanet, 1992 ; Mogenet *et al.*, 1997)

2.2.2 La voie d'inoculation

L'inoculation en **IM profonde** au niveau des muscles du bréchet permet, dans une période assez moyenne (ni longue, ni courte) d'observer des signes cliniques d'une colisépticémie avec une évolution vers la mort pouvant aller jusqu'à 07 jours. Cette technique

d'injection est rapide et facile à réaliser et permet d'inoculer une dose exacte de l'agent pathogène et identique à chaque sujet.

Tableau 9: Les Voies D'administration De L'inoculum.

Voie d'inoculation	Temps d'apparition des symptômes	Durée	Technique
P. O. (dans le jabot)	12 à 21 jours	Longue	Aisée
I. M. (dans le muscle du bréchet)	02 à 07 jours	Moyenne	Aisée
I. V. (dans la veine ulnaire)	48 à 72 heures	rapide	Délicate

(Millemann *et al.*, 2005)

2.2.3 La période

L'inoculation se fait sur des sujets âgés entre 21 ou 28 jours (selon la croissance des oiseaux), permettant :

- De s'assurer que les poussins ne proviennent pas de couvoirs contaminés ;
- De vérifier l'homogénéité ou l'hétérogénéité de la bande ;
- D'éviter la période sensible due à : un système immunitaire immature, une flore intestinale incomplète (absence de barrière), un état de stress engendré par des manipulations diverses (transport, vaccination) ou autres causes ;
- De permettre aux poussins de développer leurs masses musculaires surtout celles du bréchet pour une inoculation en IM profonde de la souche pathogène ;
- De permettre aux poussins de développer leur système immunitaire après une période de vaccination allant de 1 à 21 jours.
- De nous assurer de la qualité de l'aliment et de l'eau (exempt de tout antibiotiques et autres produits chimiques), puisque nous en contrôlant la distribution.

2.3 CHOIX DE L'ANTIBACTERIEN ET DE SON ADMINISTRATION :

2.3.1 L'antibactérien

La FLUMEQUINE et l'ENROFLOXACINE correspondent au traitement de référence contre la colibacillose. (Stipkovits, 1988 ; Mogenet *et al.*, 1997)

2.3.2 La voie d'administration

L'eau de boisson est plus appropriée pour sa préparation et son administration rapides ainsi que le contrôle aisé de sa qualité (utilisation d'eau minérale lors du protocole thérapeutique).

2.3.3 Le mode d'administration

Selon qu'il s'agit du mode concentré (**sur 03 heures d'abreuvement**) ou continu (**sur 24 heures d'abreuvement**), la posologie reste toujours la même (**9 mg de fluméquine/ kg PV / j** et **10 mg d'enrofloxacin/ Kg PV / j**) et se calcule en fonction du poids vif de l'animal et de la quantité d'eau consommée par jour pour permettre l'ingestion d'une dose thérapeutique efficace.

2.3.4 La durée du traitement

Elle est de 03 jours pour l'enrofloxacin et se poursuit jusqu'à 05 jours pour la fluméquine, selon l'évolution de la maladie expérimentale. L'administration de l'antibactérien se résume comme suit :

Tableau 10: Administration De L'antibactérien (Pour une posologie de :
9 mg de fluméquine / kg P.V. / j et 10 mg d'enrofloxacin / Kg P.V. / j).

Mode d'administration	Distribution	Voie	Contenant
Type Concentré	sur 03 heures	Per Os	Eau de boisson
Type Continu	sur 24 heures	Per Os	Eau de boisson

Une fiche technique, concernant l'antibactérien administré, est établie pour permettre un suivi correct du protocole thérapeutique :

Tableau 11: Fiche De Suivre Thérapeutique (Selon L'antibactérien Utilisé).

Jours de TRT	Date	Lot traité sur 03 heures d'abreuvement		Lot traité sur 24 heures d'abreuvement	
		Poids (Kg)	Eau consommée (L)	Poids (Kg)	Eau consommée (L)
1
2
3
4
5
Inoculation		Sujets inoculés [...] ou Sujets non inoculés [...]			
Antibactérien		Fluméquine [...] ou Enrofloxacin [...]			

PHOTOS DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL

1. L'ELEVAGE

1.1 MATERIEL ET PRODUITS DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL

1.2 CONDUITE DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL (DE 1 JOUR JUSQU'A 21 JOURS)

1.3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1.3.1 Séparation

1.3.2 Inoculation

1.3.3 Prélèvements

2. LES SYMPTÔMES

3. LES LESIONS

3.1 MORTALITE

3.2 AUTOPSIES

3.3 LESIONS



1. L'ELEVAGE : 1.1 MATERIEL ET PRODUITS DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL (1)



Photo : LEZZAR N.

1. Mangeoires linéaires.



Photo : LEZZAR N.

2. Abreuvoirs syphoïdes



Photo : LEZZAR N.

3. Trémies



Photo : LEZZAR N.

4. Une éleveuse



Photo : LEZZAR N.

5. Un thermomètre



Photo : LEZZAR N.

6. Un pot doseur



Photo : LEZZAR N.

7. Une balance (+/- 25g)



Photo : LEZZAR N.

8. Une balance (+/- 100g)

1. L'ELEVAGE : 1.1 MATERIEL ET PRODUITS DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL (2)



Photo : LEZZAR N.

9. Pesée des oiseaux



Photo : LEZZAR N.

10. Pesée de l'aliment



Photo : LEZZAR N.

11. L'aliment (Démarrage et croissance)



Photo : LEZZAR N.

12. Copeaux de bois (Litière)



Photo : LEZZAR N.

13. Additifs = Sels minéraux



Photo : LEZZAR N.

14. Additifs = Vitamines



Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

15. Antibactérien = La Fluméquine

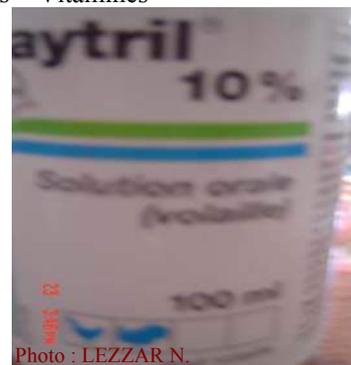


Photo : LEZZAR N.

16. Antibactérien = L'Enrofloxacin

1. L'ELEVAGE : 1.2 CONDUITE DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL (1)



Photo : LEZZAR N.

1. Bâtiment d'élevage



Photo : LEZZAR N.

2. Implantation du Bâtiment d'élevage



Photo : LEZZAR N.

3. Disposition des poussins 4 heures après leur arrivée



Photo : LEZZAR N.

4. Poussins d'1 jour



Photo : LEZZAR N.

5. Poussin de 2 jours



Photo : LEZZAR N.

6. Poussin de 3 jours



Photo : LEZZAR N.

7. Poussin de 4 jours



Photo : LEZZAR N.

8. Poussin de 5 jours

1. L'ELEVAGE : 1.2 CONDUITE DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL (2)



Photo : LEZZAR N.

9. Poussin de 6 jours



Photo : LEZZAR N.

10. Poussin de 7 jours



Photo : LEZZAR N.

11. Poussin de 8 jours



Photo : LEZZAR N.

12. Poussin de 9 jours



Photo : LEZZAR N.

13. Poussin de 10 jours



Photo : LEZZAR N.

14. Poussin de 11 jours



Photo : LEZZAR N.

15. Poussin de 12 jours



Photo : LEZZAR N.

16. Poussin de 13 jours

1. L'ELEVAGE : 1.2 CONDUITE DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL (3)



17. Poussin de 14 jours



18. Poussin de 15 jours



19. Poussin de 16 jours



20. Poussin de 17 jours



21. Poussin de 18 jours



22. Poussin de 19 jours



23. Poussin de 20 jours



24. Poussin de 21 jours (Entrée à l'essai expérimental)

1. L'ÉLEVAGE : 1.3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL (1.3.1 Séparation)



Photo : LEZZAR N.

1. Séparation du cheptel en lots expérimentaux (1)



Photo : LEZZAR N.

2. Séparation du cheptel en lots expérimentaux (2)



Photo : LEZZAR N.

3. Séparation du cheptel en lots expérimentaux (3)



Photo : LEZZAR N.

4. Séparation du cheptel en lots expérimentaux (4)



Photo : LEZZAR N.

5. Lot de 2 sujets



Photo : LEZZAR N.

6. Lot de 5 sujets



Photo : LEZZAR N.

7. Lot de 10 sujets



Photo : LEZZAR N.

8. Disposition des mangeoire et abreuvoir par lot

1. L'ELEVAGE : 1.3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL (1.3.2 Inoculation)



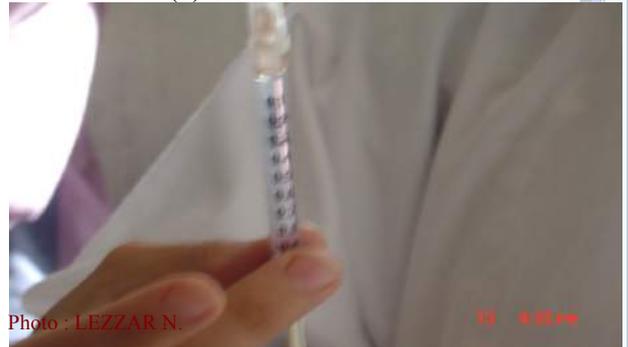
1. L'inoculum (1)



2. L'inoculum (2)



3. L'inoculum (3)



4. L'inoculum (4)



5. Essai expérimental (Inoculum d'essai)



6. L'inoculation (Inoculum final)



7. Sujet de l'essai 8 jours après l'inoculation



8. Sujet de l'essai 12 jours après l'inoculation

1. L'ELEVAGE : 1.3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL (1.3.3 Prélèvements)



Photo : LEZZAR N.

15 11:12 AM

1. Humidifier l'écouvillon stérile d'eau distillée stérile



Photo : LEZZAR N.

16 11:13 AM

2. Capsuler le flacon d'eau distillée après flamage



Photo : LEZZAR N.

16 12:34 PM

3. Saisir un sujet au hasard pour effectuer le prélèvement



Photo : LEZZAR N.

16 11:13 AM

4. Mettre en évidence la région cloacale



Photo : LEZZAR N.

16 11:14 AM

5. Introduire l'écouvillon humide dans le cloaque

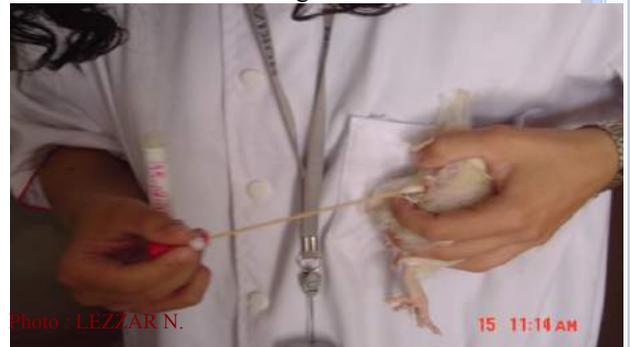


Photo : LEZZAR N.

15 11:14 AM

6. Effectuer une rotation avant de retirer l'écouvillon



Photo : LEZZAR N.

15 11:14 AM

7. Remettre l'écouvillon délicatement dans son étui



Photo : LEZZAR N.

16 12:42 PM

8. Transporter les prélèvements du jour au laboratoire

2. LES SYMPTOMES (1)



Photo : LEZZAR N.

1. Sujet haletant suite aux fortes chaleurs



Photo : LEZZAR N.

2. Retard de croissance



Photo : LEZZAR N.

3. Sujet debout prostré



Photo : LEZZAR N.

4. Sujet se maintenant debout difficilement



Photo : LEZZAR N.

5. Sujet couché prostré



Photo : LEZZAR N.

6. Sujet couché sur le coté ne se déplaçant pas à la sollicitation



Photo : LEZZAR N.

7. Sujet couché avec tête légèrement en arrière



Photo : LEZZAR N.

8. Sujet couché avec tête complètement en arrière

2. LES SYMPTOMES (2)



Photo : LEZZAR N.

9. Sujet présentant un balancement de la tête



Photo : LEZZAR N.

10. Port de la tête anormal et station debout impossible



Photos : LEZZAR N.

11. Sujet présentant des mouvements de pédalage (1)



Photos : LEZZAR N.

12. Sujet présentant des mouvements de pédalage (2)



Photo : LEZZAR N.

13. Sujet présentant des convulsions (1)



Photo : LEZZAR N.

14. Sujets présentant des convulsions (2)



Photo : LEZZAR N.

15. Sujet inerte (1)



Photo : LEZZAR N.

16. Sujets inertes (2)

3. LES LESIONS : 3.1 MORTALITE (1)

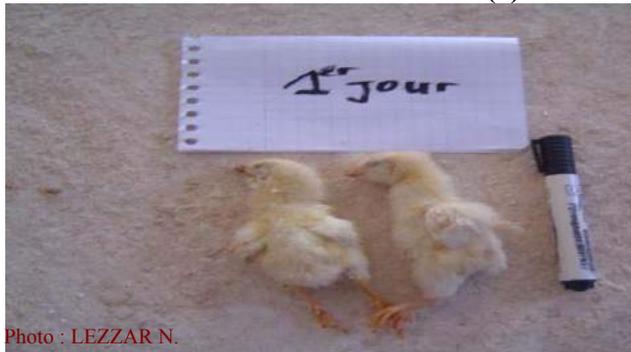


Photo : LEZZAR N.

1. Mortalité au 1^{er} jour d'âge



Photo : LEZZAR N.

2. Mortalité au 2^eme jour d'âge



Photo : LEZZAR N.

3. Mortalité au 3^eme jour d'âge



Photo : LEZZAR N.

Photos : LEZZAR N.

4. Mortalité au 4^eme jour d'âge



Photo : LEZZAR N.

5. Mortalité au 5^eme jour d'âge



Photo : LEZZAR N.

6. Mortalité au 6^eme jour d'âge



Photo : LEZZAR N.

7. Mortalité au 7^eme jour d'âge



Photo : LEZZAR N.

8. Mortalité au 8^eme jour d'âge

3. LES LESIONS : 3.1 MORTALITE (2)



9. Mortalité au 14ème jour d'âge



10. Mortalité au 21ème jour d'âge



11. Mortalité au 23ème jour d'âge



12. Mortalité au 26ème jour d'âge



13. Mortalité au 27ème jour d'âge



14. Mortalité au 28ème jour d'âge



15. Mortalité au 29ème jour d'âge



16. Mortalité au 30ème jour d'âge

3. LES LESIONS : 3.2 AUTOPSIES (1)



Photo : LEZZAR N.

1. Autopsie au 1er jour



Photo : LEZZAR N.

2. Autopsie au 2ème jour



Photo : LEZZAR N.

3. Autopsie au 3ème jour



Photo : LEZZAR N.

4. Autopsie au 4ème jour



Photo : LEZZAR N.

5. Autopsie au 5ème jour



Photo : LEZZAR N.

6. Autopsie au 6ème jour



Photo : LEZZAR N.

7. Autopsie au 21ème jour (1)



Photo : LEZZAR N.

8. Autopsie au 21ème jour (2)

3. LES LESIONS : 3.2 AUTOPSIES (2)



Photo : LEZZAR N.

9. Autopsie au 23ème jour (1)



Photo : LEZZAR N.

11. Autopsie au 26ème jour (1)



Photo : LEZZAR N.

13. Autopsie au 29ème jour (1)



Photo : LEZZAR N.

15. Autopsie au 30ème jour (1)



Photo : LEZZAR N.

10. Autopsie au 23ème jour (2)



Photo : LEZZAR N.

12. Autopsie au 26ème jour (2)



Photo : LEZZAR N.

14. Autopsie au 29ème jour (2)

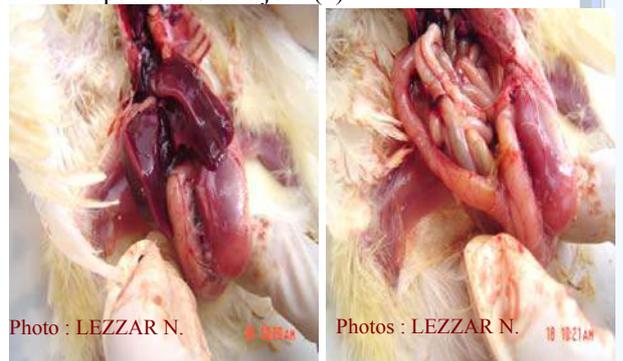


Photo : LEZZAR N.

Photos : LEZZAR N.

16. Autopsie au 30ème jour (2)

3. LES LESIONS : 3.3 LESIONS (1)



1. Congestion des organes abdominaux avec épanchement sanguin



2. Congestion des reins



3. Congestion importante du foie (1).



4. Congestion importante du foie (2).



5. Congestion importante du foie (3).



6. Congestion importante du foie seulement (1^{er} sujet)



7. Congestion importante du foie seulement (2^{ème} sujet)



8. Congestion rénale avec épanchement sanguin dans la cavité abdominale

3. LES LESIONS : 3.3 LESIONS (2)



Photo : LEZZAR N.

9. Dépôt d'urates (1)

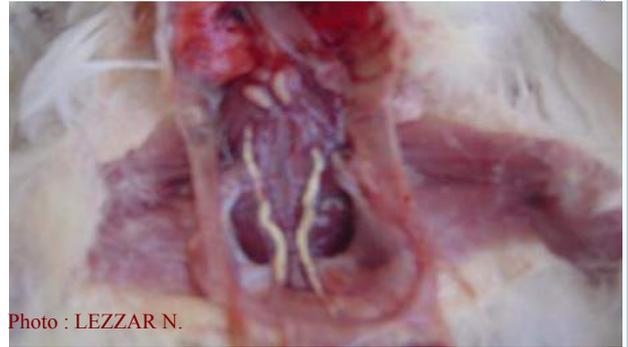


Photo : LEZZAR N.

10. Dépôt d'urates (2)



Photo : LEZZAR N.

11. Tractus digestif légèrement congestionné

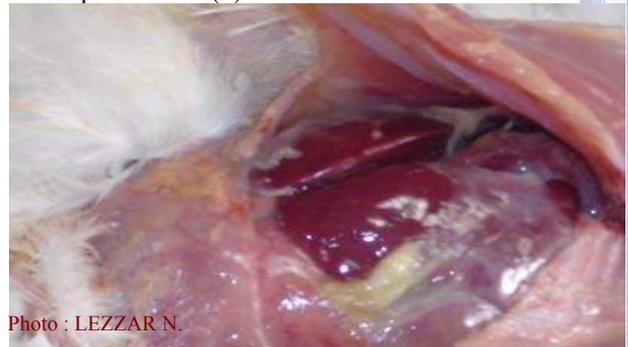


Photo : LEZZAR N.

12. Dépôt important de fibrine sur un Foie congestionné et hypertrophié



Photo : LEZZAR N.

13. Eclatement des vaisseaux sanguins (1^{er} sujet)



Photo : LEZZAR N.

14. Eclatement des vaisseaux sanguins (2^{ème} sujet)



Photo : LEZZAR N.

15. Foie congestionné avec léger exsudat fibrineux à la surface



Photo : LEZZAR N.

16. Foie légèrement foncé

3. LES LESIONS : 3.3 LESIONS (3)



Photo : LEZZAR N.

17. Foie et rate très congestionnés (1)



Photo : LEZZAR N.

18. Foie et rate très congestionnés (2)



Photo : LEZZAR N.

19. Foie normal à gauche, Foie très congestionné à droite



Photo : LEZZAR N.

20. Foies de couleur très foncée à droite



Photo : LEZZAR N.

21. Foies et rates correspondantes de couleur foncées



Photo : LEZZAR N.

22. Légère ascite (aspect brillant des organes)



Photo : LEZZAR N.

23. Légère congestion des intestins (1^{er} sujet)



Photo : LEZZAR N.

24. Légère congestion des intestins (2^{ème} sujet)

3. LES LESIONS : 3.3 LESIONS (4)



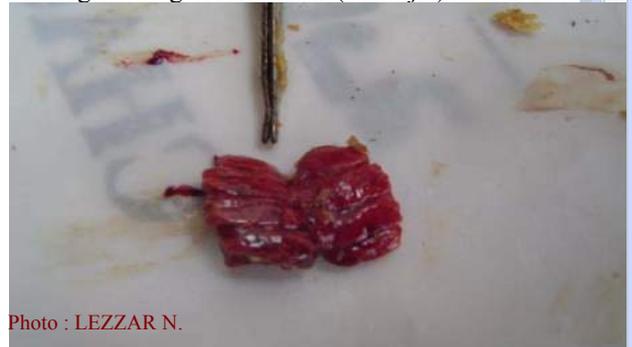
25. Légère congestion des reins



26. Légère congestion du foie (1^{er} sujet)



27. Légère congestion du foie (2^{ème} sujet)



28. Poumons légèrement congestionnés



29. Rate hypertrophiée à droite



30. Rate très hypertrophiée



31. Système Nerveux Central normal (1)



32. Système Nerveux Central normal (2)

AU NIVEAU DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE

1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Avant la réception des prélèvements en provenance de l'élevage expérimental, il faut tout d'abord établir un plan de travail à suivre pour chaque série de prélèvements reçus:

➤ Définir les jours de prélèvements : Ce sont des jours définis par rapport au jour J0 (jour de l'inoculation) et qui correspondent à une période bien précise du protocole expérimental.

Tableau 12: Jours De Prélèvements Et Périodes Correspondantes Du Protocole Expérimental.

Jours de prélèvements	Périodes du protocole expérimental
J-4	Essai expérimental (inoculum d'essai) sur trois sujets du cheptel
J-3	Séparation du cheptel en lots expérimentaux
J-2	
J-1	
J0	Jour de l'inoculation (inoculum final)
J1	
J2	Premier jour de traitement à la fluméquine et à l'enrofloxacin
J3	Deuxième jour de traitement à la fluméquine et à l'enrofloxacin
J4	Troisième jour de traitement à la fluméquine et à l'enrofloxacin
J5	Quatrième jour de traitement à la fluméquine
J6	Cinquième jour de traitement à la fluméquine
J7	24 heures après l'arrêt du protocole thérapeutique
J8	48 heures après l'arrêt du protocole thérapeutique

(cf. Annexe 16 et 17)

➤ Etablir un code pour chaque prélèvement : Sur chaque prélèvement un code est mentionné pour identifier son origine (lot expérimental et date) et faciliter l'interprétation des résultats par la suite : « Code = la date / un lot expérimental ou un sujet de l'essai expérimental / un jour de prélèvement ». Exemple : 13-08-05 / F124 / J5. (Les sujets inoculés ou non sont désignés par + ou - respectivement).

Tableau 13: Paramètres Définissant Le Code Des Prélèvements.

LOTS EXPERIMENTAUX												
T	Fl03	Fl24	En03	En24	T	Fl03	Fl24	En03	En24	3 Sujets de l'essai (A, B, C)		
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-			
JOURS DE PRELEVEMENTS												
J-4	J-3	J-2	J-1	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8

➤ Définir le type de bactéries à rechercher pour chaque série de prélèvements : Le type de bactéries recherchées dépend de 2 paramètres (lots expérimentaux et jours des prélèvements) comme le montre le tableau suivant :

Tableau 14: Paramètres Définissant La Recherche Bactériologique.

Paramètres	LOT EXPERIMENTAUX												
	T	FL03	FL24	EN03	EN24	T	FL03	FL24	EN03	EN24	Sujets d'essai		
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-			
JOURS DES PRELEVEMENTS	J-4	Recherche des bactéries de la flore fécale									Recherche de O78 inoculée.		
	J-3	+											
	J-2	Recherche d' <i>E. coli</i> surtout											
	J-1	=> Pour Identification de la flore fécale bactérienne.											
	J0	Recherche de O78 inoculée.	Recherche de O78 inoculée.				Recherche d'éventuelle O78 transmitt	Pas de prélèvements effectués (Aucune recherche).					Recherche effectués
	J1												
	J2		Recherche d' <i>E. coli</i> +					Recherche d' <i>E. coli</i> => Pour					Pas de prélèvements effectués (Aucune recherche).
	J3		Recherche de O78 inoculée =>					rechercher l'Antibiorésistance					
	J4		Pour rechercher					(pour une étude comparative).					
	J5		l'Antibiorésistance.										
J6													
J7													
J8													

Remarque : Chaque recherche nécessite une méthode bactériologique spécifique :

- L'identification de la flore fécale bactérienne se fait par la Galerie biochimique classique.
- La recherche d'*E. coli* se fait par la Galerie biochimique classique et/ou API 20 E.
- La recherche de O78 inoculée se fait par le Test sérologique (sérum spécifique).
- La recherche de l'Antibiorésistance se fait par l'Antibiogramme.

➤ Déterminer les manipulations à faire pour chaque série de prélèvements :

A la réception de chaque prélèvement, on effectue les manipulations suivantes :

➤ Enrichissement des prélèvements du jour dans un milieu B.H.I.B. pendant 3 heures puis ensemencement sur les milieux de culture suivants: Gélose Nutritive, Héktoen, Chapman et éventuellement Base Gélose au Sang (pour l'identification de la flore fécale bactérienne); et, Gélose Nutritive, Héktoen (pour la Recherche d'*E. coli*), et Chapman (comme témoin d'une éventuelle contamination lors de manipulations de réisolement) => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

➤ Réisolement sur Héktoen des colonies Lactose (+), présentes dans les milieux ensemencés la veille, pour obtenir une culture pure => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

➤ Réalisation d'une mini galerie biochimique classique (à partir des colonies lactose (+) réisolées la veille sur Héktoen) sur les milieux suivants:

- Milieu Urée-Indole (orange) ;
- Milieu Clark & Lubs (jaune pâle) ;
- Milieu Citrate de SIMMONS (vert) ;
- Milieu T.S.I. (rouge orange) ;
- Milieu Mannitol (rouge).

=> Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

➤ Après lecture de la galerie biochimique et confirmation d'une *E. coli*, prélever les colonies à partir du milieu T.S.I. et les réisoler sur Héktoen => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

➤ Prélever une seule colonie d'*E.coli* à partir du milieu Héktoen de la veille, et la conserver (dans un milieu de conservation, BIO-RAD) pour une étude sérologique et un antibiogramme.

➤ Etablir une base de données pour récolter les résultats obtenus. (cf. Annexes)

2. MATERIEL

Le matériel utilisé dépend de la méthode employée, en effet, certains articles d'équipement, de milieux et de produits et réactifs sont nécessaires pour effectuer un type de manipulation comme ils peuvent être commun à plusieurs autres techniques de laboratoire.

2.1 EQUIPEMENT DE LABORATOIRE

- Autoclave (pour la stérilisation),
- Balance électronique (pour la pesée des composantes des milieux de culture déshydratés),
- Agitateur type Vortex (pour homogénéiser la suspension bactérienne),
- Distillateur (pour produire l'eau distillée),

- Etuve à 35°C (pour apporter les conditions thermiques nécessaire aux cultures bactériennes),
- Réfrigérateur (pour stocker les milieux de culture et les colonies bactériennes),
- Spectrophotomètre (pour la préparation de l'inoculum).

2.2 MATERIELS DE LABORATOIRE

2.2.1 Pour la préparation de l'inoculum:

- Tubes en verre à capsule métallique (à vis),
- Portoir pour tubes,
- Micropipettes avec embout à usage unique,
- Cuves à spectrophotomètre,
- Pissette (pour le rinçage de la cuve à l'eau distillée).

2.2.2 Pour l'étude des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques:

- Microscope binoculaire à chariot mobile,
- Bec bunsen,
- Fioles,
- Anse de platine,
- Pipettes Pasteur stériles cotonnées (coton cardé),
- Micropipettes avec embout à usage unique,
- Tubes en verre à capsule métallique (à vis),
- Boîtes de Pétri rondes de 90 mm de diamètre,
- Portoir pour tubes,
- Lames et Lamelles,
- Portoir pour lames.

2.2.3 Pour le sérotypage:

- Pipettes Pasteur stériles cotonnées (coton cardé),
- Lames.

2.2.4 Pour l'antibiogramme:

- Ecouvillons stériles,
- Distributeur de disques (à 6 cartouches),
- Pince anatomique (pour les disques d'antibiotiques),
- Pied à coulisse métallique (pour la lecture).

2.3 PRODUITS ET REACTIFS

2.3.1 Pour la préparation de l'inoculum:

- **La souche pathogène d'*Escherichia coli* de sérotype O78:K80** est une culture pure ensemencée sur milieu Héктоen et provenant du Laboratoire Vétérinaire Régional d'El Khroub-CONSTANTINE.
- **PBS Buffer Powder** est une poudre tampon de **Phosphate Buffered Saline** à pH 7.4, conditionnée dans un sachet et portant les références suivantes : Catalog: 1011 / Lot: 0231500 / Contents: 10.2 g / Exp: 11/07. Cette poudre se compose en générale de phosphate disodique (Na_2HPO_4), de phosphate de potassium (KH_2PO_4) et de chlorure de sodium (NaCl). Elle est diluée dans 1 litre d'eau distillée et stérilisée pour former une solution saline tamponnée adaptée à un usage en culture cellulaire (et utilisée également comme un milieu Blanc dans le spectrophotomètre).
- **L'Eau distillée** (Milieu de dissolution de la poudre tampon de P.B.S.).

2.3.2 Pour le sérotypage:

- **Le sérum spécifique à la souche O78:K80** est une suspension dans un flacon (de 5 ml) portant les références suivantes: Réactif E. coli / Volaille O78 K80 / Lot: 100-02 / I-221-055-01 et provenant du Service Vétérinaire de l'Institut Pasteur d'El Kouba-ALGER (pour le test d'agglutination sur lame).
- **L'Eau physiologique** (pour le test d'auto-agglutination).

2.3.3 Pour la coloration de Gram:

- Violet de Gentiane,
- Lugol,
- Alcool,
- Fuchsine,
- Huile à immersion.

2.3.4 Pour la galerie biochimique classique:

- Disques de Sélénite (rose),
- Milieu Urée-Indole (orange),
- Réactif Kovacs (jaune),
- Réactif Rouge de Méthyle (rouge).

2.3.5 Pour la galerie biochimique API 20 E:

- Huile de vaseline stérile (clair),
- Réactif TDA (orange),
- Réactif Kovacs (jaune),
- Réactifs de VOGES PROSKAUER : VP I (clair) et VP II (rouge cerise).

2.3.6 Pour l'antibiogramme:

- Disques pour antibiogramme :

Ils se présentent sous forme d'une cartouche contenant 50 disques imprégnés d'un antibiotique donné et sur cette cartouche BIO-RAD on peut lire : le nom de l'antibiotique (sa D.C.I.) ; son abréviation ; la charge d'antibiotique sur le disque (en μg) ; le lot ; la date de péremption ; le laboratoire (adresse) et les conditions de stockage. Exemple : NALIDIXIC ACID ; NA ; 30 μg ; 4A2238 ; 2006-01-30 ; Bio-Rad, 92430 Marnes-la-Coquette-France ; +2°C à +8°C.

Les disques utilisés pour rechercher les souches d'*Escherichia coli* résistantes aux quinolones sont :

- Disque UB (Fluméquine).
- Disque NA (Acide nalidixique).
- Disque NOR (Norfloxacin).
- Disque PEF (Pefloxacin).
- Disque CIP (Ciprofloxacin).

Ces disques sont fournis par le Service de Bactériologie du CHU de Constantine.

2.4 MILIEUX DE CULTURE

Les milieux de culture se présentent sous différents aspects ; nous avons les milieux prêts en tubes qui peuvent être utilisés directement, les milieux prêts en flacons qui doivent d'abord être liquéfiés au bain-marie ou à l'autoclave et enfin, les milieux de culture déshydratés (en sachets ou en flacons) que l'on doit dissoudre dans l'eau distillée et porter à ébullition avant leur utilisation. Les modalités de préparation de ces différents milieux de culture sont indiquées sur l'emballage où l'on peut lire : Préparation ou Mode d'emploi. ; On retrouve également, les différents composants du milieu de culture sous les termes de : Composition, Ingrédients par litre ou encore Formule en g/l d'eau distillée. Ces composants diffèrent d'un laboratoire à un autre.

Une fois ces milieux préparés, qu'ils soient solides ou liquides, ils vont servir à toutes sortes de manipulations : l'isolement, l'identification, la conservation et l'antibiogramme.

2.4.1 Les milieux d'isolement:

2.4.1.1 Les milieux liquides (les bouillons = Broth)

▪ Bouillon au Cœur-cerveau (B.H.I.B. = Brain Heart Infusion Broth) :

➤ Il se présente dans un flacon contenant 250 g de milieu de culture déshydraté de BHIB et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un milieu adapté à la croissance des micro-organismes.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Cœur-Cerveau infusion37

à pH : 7.4 +/- 0.2

N.B. : A conserver dans un endroit frais en absence d'humidité et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Dissoudre 37 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer doucement jusqu'à dissolution totale puis répartir. Stériliser à l'Autoclave à 121°C pendant 15 mn.

- 250 g de poudre permettent de préparer 6.7 litres de milieu.

2.4.1.2 Les milieux solides (les géloses = Agar)

▪ Gélose Nutritive (G.N) :

➤ Elle se présente dans un carton de 18 flacons, contenant chacun 225 ml de gélose nutritif et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un milieu universel pour la culture, la croissance et la numération des germes peu exigeants dans les eaux, les boissons et les produits biologiques.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Peptone10

- Extrait de viande.....3

- Extrait de levure.....3

- Chlorure de sodium.....5

- Agar.....10

à pH : 7.3 +/- 0.2

N.B. : A conserver dans un endroit frais et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Liquéfier le milieu gélosé au bain-marie bouillant pendant 45 mn pour les flacons de 225 ml ou à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn. Une fois fondu, laisser refroidir aux environs de 45-50°C puis couler en boîtes de Pétri.

- 225 ml permettent de préparer environ 7 à 8 boîtes de Pétri.

▪ **Gélose Héktoen + additif Héktoen :**

➤ Elle se présente dans un carton de 18 flacons, contenant chacun 225 ml de gélose d'Héktoen, avec des ampoules contenant un additif Héktoen et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements les plus divers.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Peptone pepsique de viande.....10
- Extrait de viande.....3
- Extrait de levure.....3
- Salicine.....2
- Saccharose.....12
- Lactose.....12
- Sels biliaires.....4
- Bleu de bromothymol.....0.064
- Chlorure de sodium.....5
- Fuchsine basique.....0.1
- Agar.....18

à pH : 7.4 +/- 0.2

N.B. : A conserver dans un endroit frais et tenir les flacons correctement fermés

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Liquéfier le milieu gélosé au bain-marie bouillant pendant 45 mn pour les flacons de 225 ml ou à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn. Une fois fondu, laisser refroidir aux environs de 45-50°C puis ajouter l'additif Héktoen (1 ampoule par flacon), agiter par rotation le flacon pour bien mélanger l'additif à la gélose et couler en boîtes de Pétri.

- 225 ml permettent de préparer environ 7 à 8 boîtes de Pétri.

▪ **Gélose Chapman :**

➤ Elle se présente dans un carton de 18 flacons, contenant chacun 225 ml de gélose nutritif et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un milieu sélectif pour l'isolement et l'enrichissement des staphylocoques dans les produits biologiques en microbiologie médicale.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Tryptone	5
- Extrait de viande.....	3
- Extrait de levure.....	3
- Chlorure de sodium.....	70
- Péptone bactériologique.....	10
- Mannitol.....	10
- Rouge de phénol.....	0.05
- Agar.....	18

à pH : 7.4 +/- 0.1

N.B. : A conserver dans un endroit frais et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Liquéfier le milieu gélosé au bain-marie bouillant pendant 45 mn pour les flacons de 225 ml ou à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn. Une fois fondu, laisser refroidir aux environs de 45-50°C puis couler en boîtes de Pétri.

- 225 ml permettent de préparer environ 7 à 8 boîtes de Pétri.

▪ **Base Gélose au Sang (B.G.S.) + sang (frais ou cuit):**

➤ Elle se présente dans un carton de 18 flacons, contenant chacun 225 ml de solution de Base Gélose au Sang et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE. Les poches de sang sont livrées à la demande (au moment de la préparation de la gélose).

➤ C'est un milieu nutritif de base utilisé pour la préparation d'Agar au sang (mouton, cheval, lapin, humain) en vue de l'isolement et de l'enrichissement de la culture des micro-organismes pathogènes exigeants ainsi que pour l'identification des formes hémolytiques. Le sang défibriné stérile de mouton est celui qui convient le mieux à la préparation des boîtes de gélose au sang.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Peptone de viande.....	10
- Peptone de caséine.....	5

- Extrait de levure.....3
- Chlorure de sodium.....5
- Agar.....18

à pH : 6.9 +/- 0.1

N.B. : A conserver dans un endroit frais et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Pour la préparation des boites de gélose au sang frais :

Liquéfier le milieu gélosé au bain-marie bouillant pendant 45 mn pour les flacons de 225 ml ou à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn. Une fois fondu, laisser refroidir aux environs de 45-50°C puis ajouter 2 à 10% de sang défibriné stérile, agiter par rotation le flacon pour homogénéiser le mélange et couler en boites de Pétri.

- Pour la préparation des boites de gélose au sang cuit :

Liquéfier le milieu gélosé au bain-marie bouillant pendant 45 mn pour les flacons de 225 ml ou à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn. Une fois fondu, laisser refroidir aux environs de 45°C puis ajouter 5% de sang défibriné stérile. Porter le flacon dans un bain-marie dont la température est voisine de 80°C et l'y maintenir pendant 10 à 15 mn. Laisser refroidir à nouveau aux environs de 45°C, agiter par rotation le flacon pour homogénéiser le mélange et couler en boites de Pétri.

- 225 ml permettent de préparer environ 7 à 8 boites de Pétri.

2.4.2 Les milieux d'identification:

2.4.2.1 Les milieux liquides (les bouillons = Broth)

▪ Bouillon au Sélénite F (S.F.B. S/C) :

➤ Elle se présente dans un carton de 18 flacons, contenant chacun 100 ml de Bouillon au Sélénite Acide Sodium et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un milieu d'enrichissement au sélénite acide de sodium pour la recherche des salmonelles dans les selles, l'eau ou les produits alimentaires.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Tryptone5
- Peptone5
- Phosphate disodique.....4
- Mannitol.....4

à pH : 7 +/- 0.2

N.B. : A conserver dans un endroit frais et tenir les flacons correctement fermés.

- Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :
 - Répartir dans des tubes en verre à raison de 5 ou 10 ml par tube. Stériliser à la vapeur pendant 30 mn. Ne pas autoclaver, car un excès de chauffage est nuisible.
 - 100 ml g de solution permettent de préparer 10 à 20 tubes.

▪ **Milieu Clark & Lubs :**

- Il se présente dans un flacon contenant 250 g de milieu de culture déshydraté de milieu Clark & Lubs et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.
- C'est un milieu d'identification des germes par la réaction au Rouge de Méthyle et la recherche de l'acétylméthyl-carbinol.
- Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :
 - Polypéptone7
 - Glucose.....5
 - Phosphate de potassium.....5
 à pH : 6.9

N.B. : A conserver dans un endroit frais en absence d'humidité et tenir les flacons correctement fermés.

- Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :
 - Dissoudre 17 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer doucement jusqu'à dissolution totale puis répartir. Stériliser à l'Autoclave à 120°C pendant 15 mn.
 - 250 g de poudre permettent de préparer 14.7 litres de milieu.

▪ **Milieu Urée-Indole :**

- Il se présente dans un flacon contenant 250 g de milieu de culture déshydraté de milieu Urée-Indole et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.
- C'est un milieu pour l'identification des entérobactéries par la présence d'une uréase, la production d'indole à partir du tryptophane et la présence d'une tryptophane-désaminase.
- Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :
 - L-Tryptophane...3
 - Phosphate monopotassique.....1
 - Phosphate bipotassique.....1
 - Chlorure de sodium.....5
 - Urée.....20

- Rouge de phénol.....0.025
- Alcool à 95°.....10 ml

à pH : 6.7

N.B. : A conserver dans un endroit frais en absence d'humidité et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Dissoudre 30 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer doucement jusqu'à dissolution totale puis répartir. Stériliser à l'Autoclave à 121°C pendant 15 mn.
- 250 g de poudre permettent de préparer 8.3 litres de milieu.

2.4.2.2 Les milieux solides (les géloses = Agar)

▪ Gélose Citrate de SIMMONS :

➤ Elle se présente dans un flacon contenant 250 g de milieu de culture déshydraté de milieu de Citrate de SIMMONS et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un milieu pour la différenciation des entérobactéries, basé sur l'utilisation du citrate, seule source de carbone.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Sulfate de magnésium0.2
- Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1
- Phosphate dipotassique.....1
- Citrate de sodium.....2
- Chlorure de sodium.....5
- Bleu de Bromothymol.....0.08
- Agar.....15

à pH : 6.8 +/- 0.2

N.B. : A conserver dans un endroit frais en absence d'humidité et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Dissoudre 24.2 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer doucement jusqu'à dissolution totale puis répartir. Stériliser à l'Autoclave à 121°C pendant 15 mn.
- 250 g de poudre permettent de préparer 10.3 litres de milieu.

▪ **Gélose de T.S.I. (Triple Sugar Iron) :**

➤ Elle se présente dans un flacon contenant 250 g de milieu de culture déshydraté de milieu de Citrate de T.S.I. (Triple Sugar Iron) et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un milieu pour la différenciation des entérobactéries par la fermentation de trois sucres (Glucose, Lactose et Saccharose), la production d'H₂S et de gaz.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Extrait de viande	3
- Extrait de levure.....	3
- Péptone.....	20
- Glucose.....	1
- Lactose.....	10
- Saccharose.....	10
- Citrate de fer ammoniacal.....	0.3
- Chlorure de sodium.....	5
- Thiosulfate de sodium.....	0.3
- Rouge de phénol.....	0.05
- Agar.....	16

à pH : 7.4 +/- 0.1

N.B. : A conserver dans un endroit frais en absence d'humidité et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Dissoudre 68.6 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer doucement jusqu'à dissolution totale puis répartir. Stériliser à l'Autoclave à 121°C pendant 15 mn.

- 250 g de poudre permettent de préparer 3.6 litres de milieu.

▪ **Gélose de Mannitol-Mobilité**

➤ Elle se présente dans un flacon contenant 250 g de milieu de culture déshydraté de milieu de Mannitol et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

➤ C'est un des milieux utilisés pour la différenciation des entérobactéries.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Extrait de viande	3
- Péptone.....	15
- Mannitol.....	10

- Nitrate de potassium.....1
- Rouge de phénol.....0.05
- Agar.....4

à pH : 7.8

N.B. : A conserver dans un endroit frais en absence d'humidité et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Dissoudre 33 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer doucement jusqu'à dissolution totale puis répartir. Stériliser à l'Autoclave à 121°C pendant 15 mn.
- 250 g de poudre permettent de préparer 7.5 litres de milieu.

2.4.2.3 La galerie API 20 E (BIOMERIEUX) :

API 20 E est un système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif fastidieux. Ce système se présente sous forme de coffret contenant plusieurs tests. Chaque test comprend: une galerie API 20 E comportant 20 microtubes (correspondant à 20 tests biochimiques miniaturisés) dans une boîte d'incubation, munit d'une fiche de résultats et d'une notice.

L'identification d'une bactérie avec le système API 20 E consiste à réaliser 20 tests avec la galerie API 20 E, puis à interpréter les résultats obtenus, à l'aide du tableau de lecture et du tableau d'identification de la NOTICE TECHNIQUE fournit avec la galerie, ou à l'aide du CATALOGUE ANALYTIQUE qui fournit l'identification d'un grand nombre de profils numériques obtenus sur API 20 E, ce qui confère une grande fiabilité à l'interprétation des résultats. (Anonyme 1, 1994 ; Anonyme 2, 2002)

2.4.3 Le milieu de conservation:

▪ Milieu de conservation pour souches bactériennes (BIO-RAD) :

Il s'agit d'une gélose de conservation, conditionnée dans des tubes en verre de 2.6 ml portant la référence 63683F et stockée à +2 à 8°C.

2.4.4 Le milieu pour l'antibiogramme:

▪ Milieu Mueller-Hinton :

➤ Il se présente dans un carton de 18 flacons, contenant chacun 225 ml de gélose nutritif et provenant de l'Institut Pasteur d'ALGÉRIE.

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

➤ C'est un milieu non sélectif pour l'étude de la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques.

➤ Sa formule est donnée en g/l d'eau distillée et se compose de :

- Hydrolysate acide de caséine.....17.5
- Extrait de viande.....3
- Amidon.....1.5
- Agar.....16

à pH : 7.3

N.B. : A conserver dans un endroit frais et tenir les flacons correctement fermés.

➤ Sa préparation se fait selon le mode d'emploi suivant :

- Liquefier le milieu gélosé au bain-marie bouillant pendant 45 mn pour les flacons de 225 ml ou à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn. Une fois fondu, laisser refroidir aux environs de 45-50°C puis couler en boîtes de Pétri sur 4 mm d'épaisseur.
- 225 ml permettent de préparer environ 7 à 8 boîtes de Pétri.

3. METHODES

Pour identifier une bactérie (étudier ses caractères morphologiques, culturels, biochimiques et antigéniques), il est nécessaire de travailler sur des cultures pures, c'est-à-dire, sur des cultures présentant une population bactérienne issue d'une seule colonie. La technique d'isolement est le premier acte à effectuer pour toute identification bactérienne. Pour ce faire, il faut tout d'abord enrichir la suspension bactérienne pour raviver les différentes populations bactériennes et accroître leur nombre, puis les ensemercer pour mieux les distinguer les unes des autres et faciliter ainsi l'isolement de la bactérie (espèce ou population bactérienne) que l'on veut étudier.

Après l'isolement d'une seule population bactérienne, on procède à son identification par l'étude de ses différents caractères :

1. Étude des caractères morphologiques (examens microscopiques),
2. Étude des caractères culturels (culture sur milieux solides ou liquides),
3. Étude des caractères biochimiques (galerie biochimique),
4. Étude des caractères antigéniques (sérum spécifique pour le typage d'*Escherichia coli* O78:K80).

Après recherche des caractères morphologiques, culturels et biochimiques, on conserve la souche bactérienne dans un milieu de conservation pour effectuer d'autres recherches telles que:

la recherche de l'antibiorésistance (par l'antibiogramme) et le sérotypage (par le test d'agglutination sur lame).

Ces différentes étapes sont réalisées grâce à plusieurs manipulations dont chacune présente un principe et une technique propre à elle. Selon les rôles qui leurs sont attribués, nous obtenons les manipulations de laboratoire suivantes : les manipulations d'isolement, les manipulation d'identification, les manipulations de conservation et les manipulations pour l'antibiogramme. Quant aux manipulations pour la préparation de l'inoculum, elles ont pour but de reproduire expérimentalement la colibacillose aviaire qui va être le déclencheur de toute cette procédure bactériologique.

3.1 LES MANIPULATIONS POUR LA PREPARATION DE L'INOCULUM

L'inoculum est préparé à partir d'un titre initial et/ou d'une numération bactérienne :

3.1.1 A partir d'un titre initial et d'une numération bactérienne correspondante:

Selon le protocole, sur l'inoculum et l'inoculation, de Mogenet *et al.*, 1997, l'inoculum a été préparé à partir d'une suspension mère ajustée à 10^9 UFC/ml (conservée à -80°C jusqu'à son utilisation) par dilution en milieu PBS de façon à obtenir un titre de 6×10^6 CFU/ml, puis répartis en flacons stériles. L'inoculation a été réalisée à J0 par injection intra-musculaire profonde dans les muscles du bréchet, d'une dose de 0.6×10^6 CFU d'*E. coli* dans un volume de 0.1 ml. (Mogenet *et al.*, 1997)

Préparation de l'inoculum :

A partir d'un titre initial de 10^9 UFC/ml, la dose inoculée (dans un volume de 0.1 ml) est de 0.6×10^6 CFU/ 0.1 ml. Sachant que le nombre de poulets à inoculer est 50 poulets (ce qui équivaut à 50 doses x 0,1 ml = 5ml) et par mesure de sécurité, on prépare 100 doses (ce qui correspond à 10 ml) et on obtient : $100 \times 0.6 \times 10^6 = 60 \times 10^6 = 0.06 \times 10^9$. On réalise ensuite une dilution au 1/3 de la solution mère (conservée à -80°C) : pour 0.06 ml de solution mère dans 1 ml de PBS, le volume final est de $1 + 0.06 = 1.06$ ml. On homogénéise la suspension par agitation pendant 5mn puis, on dilue 1.06 ml dans $(10 - 1.06 \text{ ml}) = 8.94$ ml pour obtenir 10 ml de volume final à 1/3 de dilution. Le volume final est réparti dans deux tubes de 5ml.

3.1.2 A partir d'une numération bactérienne:

3.1.2.1 La numération de l'inoculum par étalonnage photométrique :

Dans un milieu donné (BHIB), après 4 à 6 heures d'incubation, le nombre de bactéries dans un tube atteint un chiffre à peu près constant (10^9 UFC / ml). On peut alors se baser sur ce

chiffre pour connaître la dilution nécessaire à l'obtention de l'inoculum désiré. Pour ce faire, il faut compter le nombre de bactéries formant des colonies (à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire) à des intervalles de 20 à 30 minutes. Ceci peut être obtenu en diluant la culture avec le bouillon BHIB de 10^{-4} à 10^{-8} en effectuant une dilution sériée de 0.1ml dans 10 ml : 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} et les dilutions intermédiaires 10^{-5} , 10^{-7} en diluant 1 ml de 10^{-4} et 10^{-6} dans 9 ml. Etaler au râteau 0.2 ml de chaque dilution sur une gélose (Gélose Nutritive).

Après une incubation de 24 heures à 35°C , on compte les bactéries sur les boîtes contenant plus de 100 et on multiplie par 5 et par dilution. Par exemple : 420 colonies à 10^{-9} = 2.1×10^9 .

Simultanément, on détermine la densité optique de la culture non diluée. On peut ainsi établir la courbe des densités optiques correspondant au nombre de bactéries formant colonies. A présent et dès qu'on le désire, on peut avoir un inoculum contrôlé en mesurant tout simplement la densité optique et en se référant à la courbe.

N.B. : Pour les bactéries à croissance rapide (bacille à Gram négatif) et Cocci à Gram positif, les inoculum doivent titrer de 3×10^6 à 1×10^7 . Si la culture atteint 1×10^9 , les dilutions les plus courantes sont de 1/300 pour les Gram négatif et de 1/100 pour les Gram positif. (Anonyme 3, 1985)

3.1.2.2 La numération de l'inoculum par comptage sur milieu gélosé:

On réalise la numération sur milieu gélosé après avoir obtenu une série de dilutions décimales en milieu tampon. La technique consiste à étaler sur Gélose Nutritive 0.1 ml de chaque dilution (sur une ou plusieurs boîtes) ; on compte les colonies après 48 ou 72 heures d'incubation et on applique la formule suivante : $N = n1 + n2 + n3 / t1 + t2 + t3$.

N est le nombre moyen de colonies à la dilution la plus élevée et pour le volume étalé de 0.1 ml ; $n1, n2, \dots$ est le nombre de colonies aux dilutions 1, 2, ... et $t1, t2, \dots$ est le nombre de boîtes aux dilutions 1, 2, ... multiplié par le facteur de concentration par rapport à la dilution la plus élevée. Exemple: 1 boîte de 250 colonies à la dilution 10^{-5} , 2 boîtes de 14 et 16 colonies à la dilution 10^{-6} et 1 boîte de 2 colonies à la dilution 10^{-7} ; $N = 282 / 121 = 2.3$ bactéries à la dilution 10^{-7} ; et puisque 0.1 ml ont été étalés, on obtient 2.3×10^8 bactéries / ml de suspension initiale. (Sebald et Petit, 1997)

Toutes ces techniques sont intéressantes mais posent un seul problème, celui de la numération bactérienne ; en effet, ne disposant pas d'un appareil pour compter les colonies

bactériennes, la préparation d'un inoculum (inoculum d'essai ou inoculum final) devient impossible.

Sur la base de l'étalonnage photométrique et en s'appuyant sur deux paramètres : la Densité Optique et le nombre de colonies correspondant, on réalise plusieurs séries de dilution et de sous-dilutions sur milieu P.B.S. (Phosphate Buffered Saline) afin d'obtenir des nombres de colonies comptables à l'œil nu.

3.1.3 Premier protocole de dilution: voir le schéma du protocole de la 1^{ère} série de dilution et sa Réalisation. (cf. Figure 17)

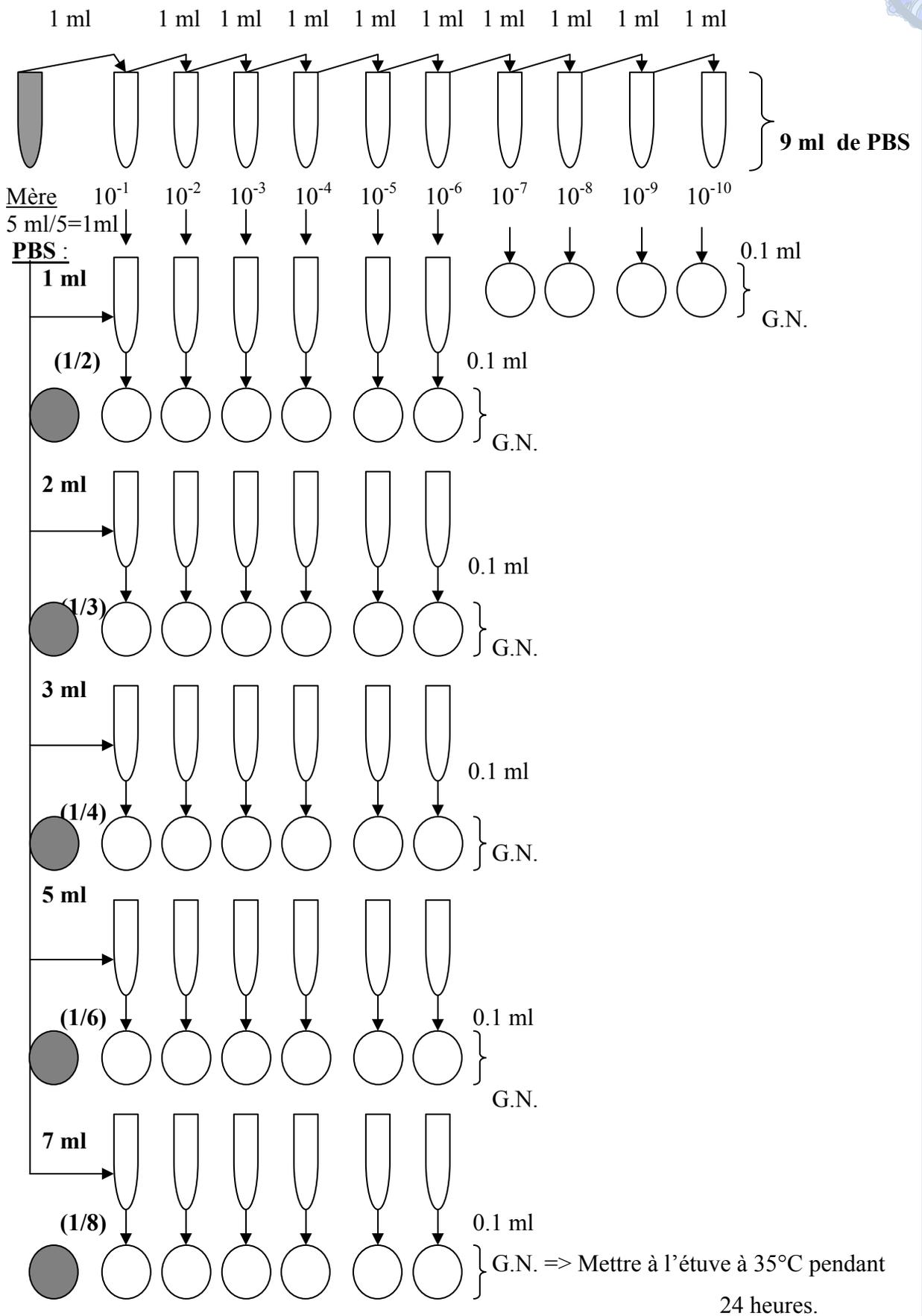


Figure 17 : Le protocole de la 1^{ère} série de dilution sur milieu P.B.S

Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

- Réalisation de la 1^{ère} série de dilution sur milieu P.B.S. (selon la figure 17):
- Réaliser une série de dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) et de sous dilution (1/2, 1/3, 1/4, 1/6, 1/8) à partir du tube Mère.
- Ensemencer (par étalement sur G.N.) 0.1 ml du tube Mère et de chaque dilution et sous dilution. => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.
- Lecture de la D.O. (Densité Optique) pour chaque dilution et sous dilution à une L.O. (Longueur d'Onde) de 625nm :

Tableau 15 : Lecture De La Densité Optique De La 1^{ère} Série De Dilution.

Dilutions et sous dilutions	Densité Optique	Dilutions et sous dilutions	Densité Optique
Mère	1.546	10^{-4}	-----
1/2	0.378	1/2	-----
1/3	0.934	1/3	-----
1/4	0.174	1/4	-----
1/6	0.596	1/6	-----
1/8	0.830	1/8	-----
10^{-1}	0.432	10^{-5}	-----
1/2	0.383	1/2	-----
1/3	0.216	1/3	-----
1/4	0.270	1/4	-----
1/6	0.110	1/6	-----
1/8	0.100	1/8	-----
10^{-2}	0.083	10^{-6}	-----
1/2	0.376	1/2	-----
1/3	0.026	1/3	-----
1/4	-----	1/4	-----
1/6	-----	1/6	-----
1/8	-----	1/8	-----
10^{-3}	0.032	10^{-7}	-----
1/2	-----	10^{-8}	-----
1/3	-----	10^{-9}	-----
1/4	-----	10^{-10}	-----
1/6	-----		
1/8	-----		

Ces résultats ont été obtenus par le spectrophotomètre du Service de Toxicologie du CHU de Constantine.

➤ Lecture des boîtes de G.N. de la 1^{ère} série de dilution sur milieu P.B.S. après 24 h d'incubation:

Tableau 16: Dénombrement Des Colonies De La 1^{ère} Série De Dilution.

Dilutions	Sous dilutions	Nombre de colonies
Mère	1/2 1/3 1/4 1/6 1/8	Comptage impossible
10⁻¹	1/2 1/3 1/4 1/6 1/8	(>300 colonies)
10⁻²	1/2 1/3 1/4 1/6 1/8	
10⁻³	1/2 1/3 1/4 1/6 1/8	
10⁻⁴	1/2 1/3 1/4 1/6 1/8	Comptage possible
10⁻⁵	1/2 1/3 1/4 1/6 1/8	
10⁻⁶	1/2 1/3 1/4 1/6 1/8	
10⁻⁷	--- --- --- --- ---	Quelques colonies
10⁻⁸	--- --- --- --- ---	
10⁻⁹	--- --- --- --- ---	
10⁻¹⁰	--- --- --- --- ---	0 colonie

Remarque : Les dilutions et sous dilutions dont le nombre de colonies est comptable possède une DO = 0 => Interprétation des résultats impossible => Protocole de dilution à refaire.

3.1.4 Deuxième protocole de dilution: voir le schéma du protocole de la 2^{ème} série de dilution et sa Réalisation. (cf. Figure 18)

Mère

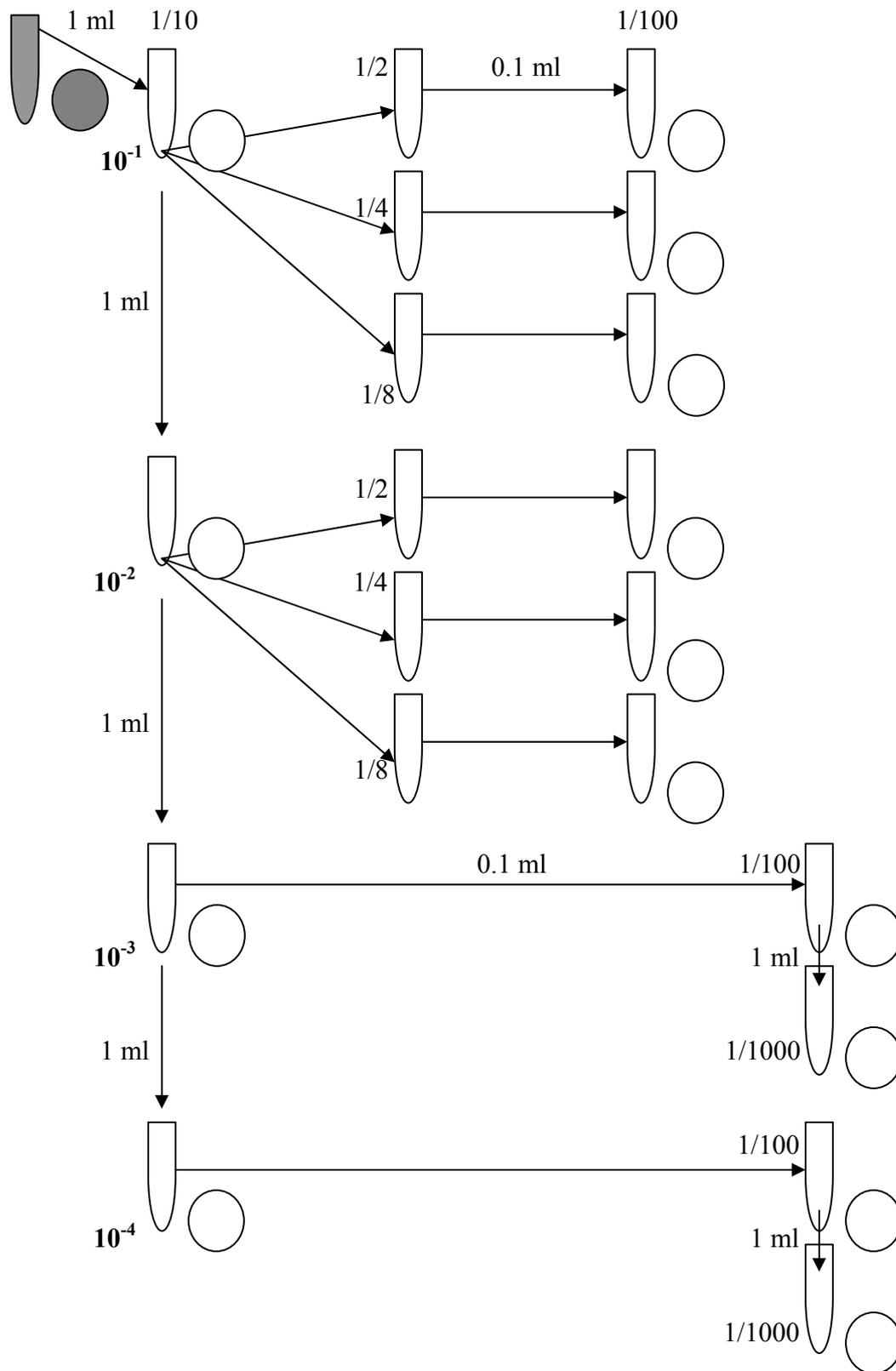


Figure 18 : Le protocole de la 2^{ème} série de dilution sur milieu P.B.S.

- Réalisation de la 2^{ème} série de dilution sur milieu P.B.S. (selon la Figure 18):
- Réaliser une série de dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) et de sous dilution (1/2, 1/4, 1/8 puis 1/100 pour les deux premières dilutions et 1/100 puis 1/1000 pour les deux dernières dilutions) à partir du tube Mère.
- Ensemencer (par étalement sur G.N.) 0.1 ml du tube Mère et de chaque dilution et sous dilution. => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.
- Lecture de la D.O. (Densité Optique) pour chaque dilution et sous dilution à une L.O. (Longueur d'Onde) de 625nm :

Tableau 17 : Lecture De La Densité Optique De La 2^{ème} Série De Dilution.

Dilutions et sous dilutions	Densité Optique
Mère	1.70
10⁻¹	0.291
1/2 → 1/100	0.160 → 0.012
1/4 → 1/100	0.101 → 0.014
1/8 → 1/100	0.016 → 0.009
10⁻²	0.026
1/2 → 1/100	0.007 → 0.003
1/4 → 1/100	0.023 → 0.002
1/8 → 1/100	0.002 → -----
10⁻³	0.029
1/100 → 1/1000	0.016 → -----
10⁻⁴	0.010
1/100 → 1/1000	----- → -----

Ces résultats ont été obtenus par le spectrophotomètre du Service de Toxicologie du CHU de Constantine.

➤ Lecture des boîtes de G.N. de la 2^{ème} série de dilution sur milieu P.B.S. après 24 h d'incubation :

Tableau 18 : Dénombrement Des Colonies De La 2^{ème} Série De Dilution.

Dilutions et sous dilutions	Nombre de colonies	
Mère	Comptage impossible (>300 colonies)	
10⁻¹		
1/100 (1/2)		
1/100 (1/4)		
1/100 (1/8)		
10⁻²		
1/100 (1/2)		
1/100 (1/4)		
1/100 (1/8)		
10⁻³		
1/100		
1/1000		90 colonies
10⁻⁴		0 colonie
1/100		
1/1000		

Remarque : Les dilutions et sous dilutions dont le nombre de colonies est comptable possède une D.O. = 0 => Interprétation des résultats impossible => Protocole de dilution à refaire.

3.1.5 Troisième protocole de dilution: voir le schéma du protocole de la 3^{ème} série de dilution et sa Réalisation. (cf. Figure 19)

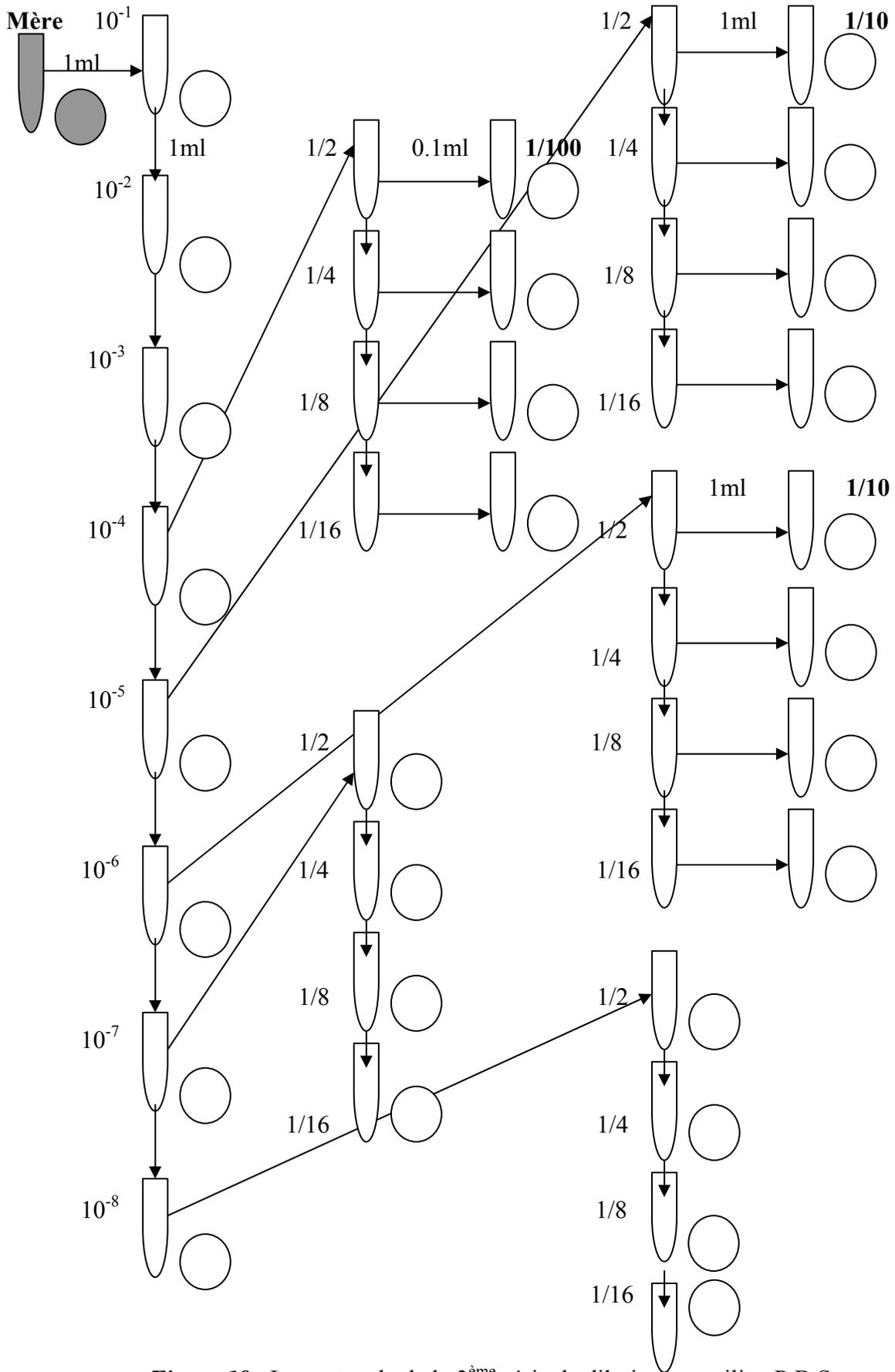


Figure 19 : Le protocole de la 3^{ème} série de dilution sur milieu P.B.S

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

- Réalisation de la 3^{ème} série de dilution sur milieu P.B.S. (selon la Figure 19):
- Réaliser une série de dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) et de sous dilution (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 pour chaque dilution, puis 1/100 pour la quatrième dilution et 1/10 pour la cinquième et sixième dilutions) à partir du tube Mère.
- Ensemencer (par étalement sur G.N.) 0.1 ml du tube Mère et de chaque dilution et sous dilution. => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.
- Lecture de la D.O. (Densité Optique) pour chaque dilution et sous dilution à une L.O. (Longueur d'Onde) de 625nm :

Tableau 19: Lecture De La Densité Optique De La 3^{ème} Série De Dilution.

Dilutions et sous dilutions	Densité Optique
Mère	0.310
10^{-1}	0.043
10^{-2}	0.023
10^{-3}	0.022
10^{-4}	0.019
1/2	0.002
1/4	0.031
1/8	0.016
1/16	0.004
10^{-5}	-----
1/2	-----
1/4	-----
1/8	-----
1/16	-----
10^{-6}	-----
1/2	-----
1/4	-----
1/8	-----
1/16	-----
10^{-7}	-----
1/2	-----
1/4	-----
1/8	-----

1/16	-----
10⁻⁸	-----
1/2	-----
1/4	-----
1/8	-----
1/16	-----

Ces résultats ont été obtenus par le spectrophotomètre du Service de Toxicologie du CHU de Constantine.

➤ Lecture des boîtes de G.N. de la 3^{ème} série de dilution sur milieu P.B.S. après 24 h d'incubation:

Tableau 20 : Dénombrement Des Colonies De La 3^{ème} Série De Dilution.

Dilutions et sous dilutions	Nombre de colonies
Mère	Comptage impossible
10⁻¹	(>300 colonies)
10⁻²	
10⁻³	
10⁻⁴	
1/100 (1/2) 1/100 (1/4)	Comptage impossible suite à la Contamination des boîtes de G.N. de ses deux sous-dilutions.
1/100 (1/8) 1/100 (1/16)	0 colonie
10⁻⁵	143 colonies
1/10 (1/2)	14 colonies
1/10 (1/4)	3 colonies
1/10 (1/8) 1/10 (1/16)	0 colonie
10⁻⁶	10 colonies
1/10 (1/2)	2 colonies
1/10 (1/4) 1/10 (1/8)	0 colonie

1/10 (1/16)	
10⁻⁷	2 colonies
1/2	1 colonie
1/4	0 colonie
1/8	
1/16	
10⁻⁸	0 colonie
1/2	0 colonie
1/4	
1/8	
1/16	

Remarque : Les dilutions et sous dilutions dont le nombre de colonies est comptable possède une DO = 0 => Interprétation des résultats impossible => Protocole de dilution à refaire.

Suite aux résultats obtenus par le spectrophotomètre et par la lecture sur milieu gélosé (Gélose Nutritive), et du fait de la non concordance de la D.O. avec le nombre de colonies obtenues, l'interprétation s'avère impossible. On procède donc à une recombinaison de toutes ces techniques et ces protocoles envisagées (ci-dessus) en se basant cette fois sur un seul paramètre : la D.O. comme unique point de repère, pour réaliser un inoculum d'essai à partir duquel on peut reproduire par la suite l'inoculum final.

3.1.6 Quatrième protocole de dilution:

3.1.6.1 Réalisation de la 4^{ème} série de dilution sur milieu P.B.S. ou **Préparation de l'inoculum d'essai**: Elle se déroule en deux étapes:

➤ 1^{ère} étape : Rechercher la différence entre le milieu P.B.S. et l'Eau physiologique (selon leurs dilutions et leurs Densités Optiques)

➤ Préparation de la suspension pathogène à différentes dilutions (1/2, 1/5, 1/10):

Dans 6 ml d'eau distillée, mettre un maximum de colonies de O78 (prélevé sur Héctoén), puis répartir à part égale (3ml) dans deux milieux différents selon le schéma suivant (cf. Figure 20) :

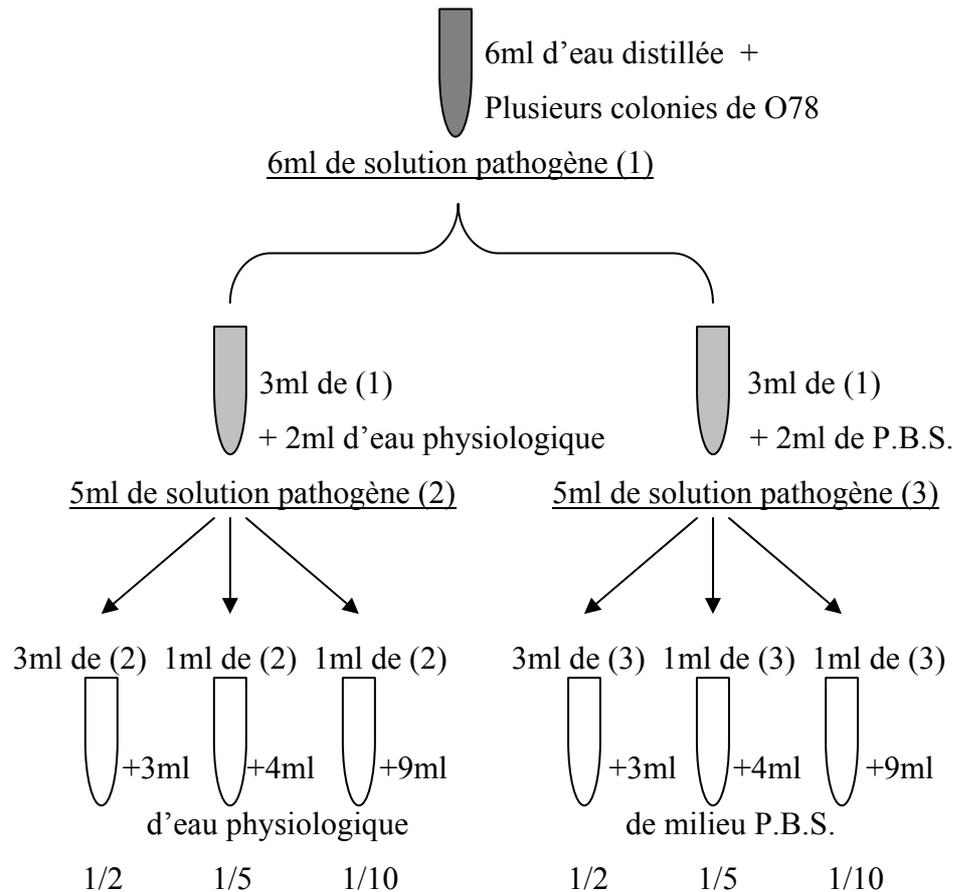


Figure 20 : Première étape du protocole de la 4^{ème} série de dilution

Remarque : Le volume total de chaque dilution est de 5 ml (au minimum) pour en faciliter la lecture par le spectrophotomètre (une fois la solution versée dans la cupule du spectrophotomètre, elle doit arriver à un niveau où elle est traversée par un faisceau lumineux).

➤ Lecture de la D.O. (Densité Optique) pour chaque dilution à des L.O. (Longueur d'Onde) différentes:

- Faire passer chaque dilution de chaque milieu par le spectrophotomètre pour obtenir leurs D.O. pour chaque L.O. puis, rechercher la DO la plus importante, correspondant à l'absorption maximale.

N.B : pour mesurer la D.O. de chaque dilution, on fait le zéro sur la solution servant de Blanc, puis on lit la D.O. correspondante obtenue par le spectrophotomètre.

Tableau 21: Lecture De La Densité Optique De La 1^{ère} Etape De La 4^{ème} Série De Dilution.

L.O. (nm)	Milieu	1/2	1/5	1/10	Milieu	1/2	1/5	1/10
400	Eau physiologique : A 625 nm, la D.O. = 0.015.	Pas de lecture de la D.O.			Phosphate Buffered Saline. : A 625 nm, la D.O. = 0.019.	Pas de lecture de la D.O.		
425		1.42	0.734	0.490		1.43	0.837	0.535
450		1.39	0.710	0.470		1.40	0.802	0.501
475		1.35	0.667	0.437		1.38	0.760	0.462
500		1.30	0.630	0.414		1.35	0.720	0.432
525		1.26	0.593	0.390		1.31	0.684	0.403
550		1.22	0.560	0.365		1.27	0.650	0.380
575		1.19	0.530	0.345		1.24	0.621	0.362
600		1.14	0.495	0.326		1.21	0.590	0.341
625		1.10	0.466	0.308		1.18	0.557	0.321
650		1.06	0.444	0.295		1.15	0.532	0.310
675		1.03	0.412	0.274		1.12	0.503	0.290
700		0.99	0.394	0.266		1.09	0.476	0.280
725		0.96	0.374	0.250		1.05	0.452	0.263
750		0.927	0.355	0.242		1.01	0.434	0.254
775		0.883	0.334	0.230		0.980	0.410	0.240
800	0.838	0.326	0.218	0.947	0.386	0.222		

Le blanc (ou solution témoin) utilisé pour la lecture de la D.O des deux milieux est l'eau distillée, et pour la lecture de la D.O de chaque dilution pour chaque milieu, on utilise comme blanc le milieu correspondant à leur propre dilution (Eau physiologique ou P.B.S.).

Résultats : il n'y a pratiquement aucune différence entre les deux milieux et la D.O. est inversement proportionnelle à la L.O. ; le choix d'un milieu ou d'une L.O. ne sont pas spécifique. On peut donc, selon le protocole de Mogenet *et al.*, (1997), choisir le milieu PBS (utilisé pour la préparation de l'inoculum) ; et selon Les Recommandations de l'O.M.S. de 2003, choisir la L.O. = 265nm (utilisée pour la préparation de l'inoculum de l'antibiogramme) comme référence pour pouvoir reproduire la suspension pathogène servant d'inoculum final. (Mogenet *et al.*, 1997 ; Anonyme 4, 2003)

➤ 2^{ème} étape : Rechercher la dose à inoculer (dose sensée provoquer un taux de mortalité inférieur à 50%)

➤ Préparation de la suspension pathogène sur milieu P.B.S. à différentes dilutions (1/2, 1/5, 1/10):

- Dans 5 ml de P.B.S., mettre un maximum de colonies de O78 (prélevé sur Héктоen), puis répartir dans trois tubes à différentes dilutions du milieu P.B.S. (1/2, 1/5, 1/10) selon le schéma suivant (cf. Figure 21):

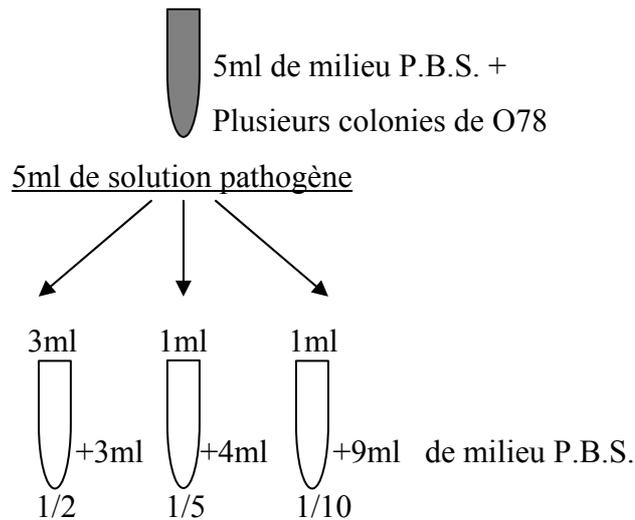


Figure 21 : Deuxième étape du protocole de la 4^{ème} série de dilution

➤ Lecture de la D.O. (Densité Optique) pour chaque dilution à une L.O. (Longueur d'Onde) de 625nm :

- Faire passer chaque dilution du milieu P.B.S. par le spectrophotomètre pour obtenir leur D.O. à une L.O. = 625 nm, afin de pouvoir reproduire l'une des trois dilution en tant qu'inoculum final.

- N.B. : pour mesurer la D.O. de chaque dilution, on fait le zéro sur la solution servant de Blanc, puis on lit la D.O. correspondante obtenue par le spectrophotomètre.

Après la lecture, inoculer 0.1 ml de chaque dilution, à raison d'une dilution par sujet de l'essai expérimental et observer les symptômes et la mortalité, afin de retrouver la dilution qui est sensée provoquer un taux de mortalité inférieure à 50% en quelques jours et de la reproduire le jour J0 (le transport des 3 inoculum d'essai vers l'élevage expérimentale se fait dans une glacière et rapidement).

Tableau 22 : Lecture De La Densité Optique De La 2^{ème} Etape De La 4^{ème} Série De Dilution.

L.O. (nm)	Blanc	1/2	1/5	1/10
400	Phosphate Buffered Saline.	Pas de lecture de la D.O.		
425		1.760	1.180	0.787
450		1.710	1.160	0.747
475		1.684	1.100	0.700
500		1.650	1.055	0.671
525		1.621	1	0.627
550		1.557	0.956	0.586
575		1.532	0.908	0.550
600		1.503	0.854	0.527
625		1.476	0.812	0.500
650		1.452	0.759	0.450
675		1.434	0.715	0.423
700		1.410	0.680	0.400
725		1.386	0.642	0.378
750		1.362	0.608	0.356
775		1.334	0.572	0.334
800		1.326	0.540	0.316

Le blanc est une solution témoin, utilisée pour la lecture de la D.O de chaque dilution.

Remarque : La lecture s'est faite également pour les autres L.O., afin d'écartier toutes erreurs de manipulations, aussi bien dans la préparation des dilutions que dans l'utilisation du spectrophotomètre.

3.1.6.2 Préparation de l'inoculum final

Le Principe:

A partir des résultats obtenues lors de l'essai expérimental, on prépare la suspension bactérienne diluée à **1/5** sur milieu P.B.S., en se referant à sa D.O. qui est de **0.812** lue à **625 nm**. (cf. Tableau 22)

La Technique:

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

Dans 5 ml de P.B.S., mettre un maximum de colonies de O78 (prélevé sur Héktoen), pour obtenir une suspension très concentrée ; puis ajuster l'inoculum en ajoutant le P.B.S. jusqu'à obtenir une suspension ayant une D.O.= 0.812 lue à 625 nm par le spectrophotomètre (l'inoculum doit atteindre au moins 7ml, car il faut prévoir, par mesure de sécurité, plus de 5ml pour inoculer 50 sujets à raison de 0.1ml / sujet).

3.2 LES MANIPULATIONS D'ISOLEMENT

Ce sont des manipulations qui vont nous permettre de passer d'une culture hétérogènes vers une culture homogène ou pure.

N.B. : À l'exception de l'enrichissement, toutes les autres manipulations sont utilisées pour l'isolement. Cependant, l'enrichissement reste une manipulation incontournable que l'on retrouve dans tout type de manipulations (isolement, identification et autres).

3.2.1 L'Enrichissement:

□ Le Principe:

C'est une manipulation qui consiste à nourrir les bactéries, pour leur permettre de survivre et de se multiplier, en les déposant dans un milieu d'enrichissement (Bouillon BHIB).

La lecture du Bouillon d'enrichissement se fait 3 à 24 heures après et consiste à décrire les caractères de turbidité du bouillon (trouble, dépôt, voile).

□La Technique:

➤ Dans un tube de 5 ml de bouillon BHIB, déposer un prélèvement bactérien (une colonie bactérienne, quelques gouttes d'une suspension bactérienne ou un écouvillon ayant servi à un prélèvement biologique en l'occurrence un prélèvement de la flore fécale). Passer le tube sur un vortex pour homogénéiser la suspension. Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

➤La lecture des tubes de BHIB 24 heures après montre, un milieu trouble, homogène, de couleur plus foncé (jaune foncé) signe d'un accroissement bactérien (celui d'*E. coli*).

3.2.2 L'Ensemencement:

L'ensemencement est une manipulation de laboratoire utilisée, aussi bien pour l'isolement des bactéries que pour leur identification bactérienne. La technique sera décrite dans sa totalité et l'on retiendra que celle qui correspond à la manipulation d'isolement.

□ **Le Principe:**

Cette manipulation consiste à lancer une culture bactérienne dans un milieu de culture, en général solide ou liquide.

➤ La lecture des milieux ensemencés se fait 24 heures après et consiste à décrire les caractères culturels des colonies bactériennes ensemencées sur boîte de Pétri (taille, couleur, forme et autres aspects des colonies), et les caractères biochimiques des colonies bactériennes ensemencées, aussi bien sur les géloses en tubes (virement des couleurs et production de gaz), que dans les milieux liquides.

□ **Les Techniques:**

➤ L'ensemencement sur milieu solide : Il dépend du matériel utilisé.

- Sur boîte de Pétri on connaît plusieurs types d'ensemencements : l'ensemencement par épuisement, consiste à étaler la suspension bactérienne sur toute la surface gélosée en stries serrées puis espacées, pour bien reconnaître les différentes colonies bactériennes et en faciliter leur prélèvement par la suite (24 h après).

L'ensemencement par inondation, consiste à inonder la boîte de Pétri entièrement de 3 à 5 ml de suspension bactérienne et réaspirer l'excès en inclinant la boîte dans plusieurs directions ; quant à l'ensemencement par étalement, il consiste, comme son nom l'indique, à étaler sur toute la surface de la gélose, une goutte de 0.1 ml de la suspension bactérienne, à l'aide d'une pipette pasteur à extrémité inclinée de 90° formant un râteau avec lequel on réalise des mouvements de bas en haut, puis de haut en bas tout en tournant la boîte de Pétri jusqu'à sa rotation complète.

Ces deux dernières techniques d'ensemencement sur milieu solide sont indiquées pour le comptage des colonies bactériennes et se font sur Gélose Nutritive.

Concernant l'ensemencement par écouvillonnage, il est réservé à la réalisation de l'antibiogramme et se fait sur milieu de Mueller-Hinton. Il consiste à étaler l'inoculum sur toute la gélose en passant l'écouvillon 2 ou 3 fois sur toute la surface du milieu après avoir tourné à chaque fois la boîte de 60° de façon à assurer un ensemencement uniforme.

- Dans les tubes, l'ensemencement va dépendre de la présentation de la gélose ; si cette dernière est inclinée, on procède à l'ensemencement par épuisement comme il est décrit précédemment, ou à l'ensemencement par inondation en laissant couler une certaine quantité de suspension bactérienne sur la pente gélosée et en éliminant l'excès. Cet ensemencement se termine, pour les

géloses inclinées présentant un culot, par une piqûre centrale qui représente également une forme d'ensemencement. Quant aux géloses non inclinées, on réalise directement une piqûre centrale après avoir effectué des stries en spirale à la surface de la gélose.

➤ L'ensemencement sur milieu liquide : Il est plus simple et consiste à déposer dans un milieu liquide, soit quelques gouttes d'une suspension bactérienne, soit une colonie bactérienne après l'avoir écrasée sur la paroi du tube et diluée dans ce même milieu liquide.

N.B. : On termine en mettant le milieu ensemencé à l'étuve à 35°C pendant 24 heures.

Toutes ces techniques d'ensemencement sont utilisées pour l'identification des bactéries, mais pour l'isolement de ces dernières on a recours qu'à l'ensemencement réalisé sur milieu solide et plus précisément sur boîte de Pétri.

➤ La lecture des boîtes de Pétri après 24 heures, met en évidence les caractères culturels des colonies bactériennes (taille, couleur, forme et autres aspects des colonies).

Nous prendrons à titre d'exemple, une boîte d'Héktoen et boîte de Chapman, toutes deux ensemencées à partir d'un prélèvement de la flore fécale d'un poulet de chair: le caractère de la couleur sera interprété comme suit :

- Pour le milieu de Chapman : Ce milieu sélectif pour l'isolement des staphylocoques possède une teneur élevée en chlorure de sodium qui inhibe la plupart des autres germes. Il renferme également du mannitol dont la fermentation est mise en évidence par le virage du rouge de phénol. La lecture se fera comme suit : Les colonies de *Staphylococcus aureus* fermentant le mannitol sont entourées d'une zone jaune et sont de taille importantes. Quant aux colonies de *Staphylococcus epidermidis*, dans la majorité des cas, apparaissent petites et entourées d'une zone rouge ou pourpre. (Anonyme 5, 1986 a)

- Pour le milieu d'Héktoen : La lecture repose sur 3 éléments : la précipitation des sels biliaires, la fermentation des sucres et la production d'hydrogène sulfuré. La précipitation de sels biliaires est mise en évidence par la formation d'un halo de sels biliaires précipités autour des colonies ; on aura donc des colonies entourées d'un halo (sels biliaires précipités) et d'autres non (pas de précipitation de sels biliaires). Quant à la fermentation des sucres, le système se base sur la fermentation éventuelle de trois sucres (lactose, saccharose et salicine) composant le milieu Héktoen. Les germes qui renferment au moins un de ces sucres donnent des colonies « saumon », les autres des colonies bleues ou vertes ; on parle également de colonies lactose + (colonies jaune saumon) et des colonies lactose – (colonies bleues ou vertes). De plus, les germes qui produisent de l'hydrogène sulfuré (H₂S) donnent des colonies à centre noir. Les aspects des colonies peuvent donc être les suivants :

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

Tableau 23 : Quelques Caractères Culturels Des Bactéries.

Colonies jaunes saumon	<i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Arizona</i>
Colonies jaunes saumon à centre noir	<i>P. vulgaris</i>
Colonies vertes ou bleuâtres	<i>Shigella</i> <i>Salmonella</i> H ₂ S (-) <i>P. morganii</i> <i>P. rettgeri</i> <i>Providencia</i>
Colonies vertes à centre noir	<i>P. mirabilis</i> <i>Salmonella</i>
Petites colonies bleues ou brunâtres	<i>Pseudomonas</i>

(Anonyme 5, 1986 c)

Dans le cas où l'on veut rechercher *E. coli*, on se base, en plus de sa couleur saumon, sur sa forme ronde et son aspect typique de colonie plate à centre ombiliqué.

3.2.3 L'Isolement:

□ Le Principe:

Il consiste à faire l'ensemencement d'une seule colonie prélevée d'une culture hétérogène (présentant plusieurs types de colonies).

□ La Technique:

Sur une boîte de Pétri présentant des colonies hétérogènes (différentes espèces bactériennes), et en se basant sur les caractères morphologique de la bactérie que l'on veut étudier (*E. coli*), on prélève une seule colonie en veillant à ne pas charger la pipette Pasteur d'autres colonies avoisinantes (prélever une colonie bien isolée) et on la décharge dans 5 ml d'eau physiologique (en écrasant la colonie prélevée contre la paroi du tube avant de la diluer dans l'eau physiologique). Après homogénéisation de la suspension bactérienne, on prélève une goutte que l'on dépose sur un coin de la gélose d'une nouvelle boîte de Pétri, et à l'aide de la pipette Pasteur ou de l'anse de platine stérilisée, on réalise à partir de la goutte déposée, des

stries serrées jusqu'à la moitié de la boîte, puis espacées dans la seconde moitié. On termine en mettant la boîte ensemencée à l'étuve à 35°C pendant 24 heures.

➤ La lecture de la boîte de Pétri après 24 heures, met en évidence les caractères culturels des colonies bactériennes (taille, couleur, aspect, forme) qui nous permettent son identification (voir l'exemple cité plus haut).

3.2.4 Le Ré-Isolement:

□ Le Principe:

Il consiste à faire l'ensemencement d'une seule colonie prélevée d'une culture homogène suspecte (présentant deux types de colonies).

□ La Technique:

Elle est identique à la technique de l'isolement.

3.2.5 Le Repiquage:

□ Le Principe:

Il consiste à faire l'ensemencement d'une seule colonie prélevée d'une culture homogène (présentant un seul type de colonies = culture pure).

□ La Technique:

Sur une boîte de Pétri présentant des colonies homogènes (culture pure), on prélève une ou deux colonies et on les décharge dans 5 ml d'eau physiologique (en écrasant les colonies prélevées contre la paroi du tube avant de les diluer dans l'eau physiologique). Après homogénéisation de la suspension bactérienne, on prélève une goutte que l'on dépose sur un coin de la gélose d'une nouvelle boîte de Pétri, et à l'aide de la pipette Pasteur ou de l'anse de platine stérilisée, on réalise à partir de la goutte déposée, des stries serrées jusqu'à la moitié de la boîte, puis espacées dans la seconde moitié. On termine en mettant la boîte ensemencée à l'étuve à 35°C pendant 24 heures.

➤ La lecture de la boîte de Pétri après 24 heures, met en évidence des colonies bactériennes identiques à celles qui ont été prélevées (présentent les mêmes caractères culturels).

3.3 LES MANIPULATIONS D'IDENTIFICATION

Après avoir isolé la bactérie que l'on veut étudier (en l'occurrence *Escherichia coli*), on part à la recherche de ses différents caractères :

3.3.1 La Recherche Des Caractères Morphologiques:

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

L'Etat frais et La Coloration de Gram sont des examens microscopiques qui permettent de définir les caractères morphologiques des bactéries et orientent dans le choix des milieux de culture.

□ **Le Principe:**

L'état frais permet d'observer la morphologie des bactéries vivantes, leur mode de regroupement et leur motilité. Quant à la coloration de gram, elle permet d'observer la morphologie des bactéries mortes, leur mode de regroupement et leurs affinités tinctoriales.

□ **La Technique:**

➤ L'état frais:

- Sur une lame, déposer une goutte d'eau physiologique et une colonie d'*E. coli* prélevée d'une boîte d'Héktoen => écraser la colonie sur la lame et la mélanger à la goutte d'eau physiologique => bien étaler la suspension sur la lame => recouvrir la suspension d'une lamelle => lire au microscope, à un grossissement 40.

- La lecture est immédiate et montre des bactéries regroupées en amas polymorphes ce qui rend l'appréciation de leur taille et leur forme difficile. Ils oscillent suite au mouvement du courant engendré par la pression de la lamelle sur la suspension bactérienne et ne se déplacent pas dans tous les sens; ce sont donc des bactéries immobiles.

➤ La Coloration de Gram:

- Réaliser une suspension pathogène à partir d'une colonie d'*E. coli* prélevée de la boîte d'Héktoen dans 5 ml d'eau physiologique => étaler une goutte de cette suspension bactérienne sur une lame => passer la lame sur un bec à bunsen pour la faire sécher et fixer les bactéries => procéder à une série de coloration dans l'ordre suivant :

1. Violet de Gentiane pendant 1 minute puis rincer à l'eau,
2. Lugol pendant 1 minute puis rincer à l'eau,
3. Alcool pendant 30 secondes puis rincer à l'eau,
4. Fuchsine pendant 1 minute puis rincer à l'eau,

=> déposer la lame sur un support de telle sorte qu'elle soit inclinée et laisser sécher => mettre une goutte d'huile à immersion => recouvrir d'une lamelle => lire au microscope, à un grossissement 100.

N.B. : On peut également prélever une colonie, l'écraser sur la lame puis la diluer dans une goutte d'eau physiologique déposée sur la lame et bien étaler le mélange.

- La lecture révèle la présence de bacilles de couleur rose (Gram négatif), regroupés en amas polymorphes.

3.3.2 La Recherche Des Caractères Cultureux:

Quelque soit le milieu de culture utilisé, il va permettre de définir les caractères généraux de la culture et des colonies.

□ Le Principe:

Selon le milieu utilisé, on observe les caractères cultureux suivant :

- Sur milieu liquide : la culture en milieu liquide permet de déterminer :
 - La zone de culture : en surface (aérobie), en profondeur (anérobie), sur toute la longueur du tube (aéro-anaérobie).
 - L'aspect général de la culture : le trouble (homogène ou hétérogène), le dépôt (visqueux ou en mie de pain), le voile (flottant ou adhérent aux parois).
- Sur milieu solide : En milieu solide et selon le matériel de culture utilisé, la gélose nous offre deux types de surface : gélose à surface inclinée (gélose en tube) et gélose à surface plane (gélose en boîte de Pétri).
 - La culture sur gélose inclinée permet de définir les caractères généraux de la culture sur la pente (en surface) et dans la gélose (porteur de la piqûre centrale) : l'aspect (envahissant ou non), la forme (filiforme, ondulée, arborescente, diffuse) et la couleur de la culture (virement de la couleur) sont les caractères à observer.
 - La culture sur boîte de Pétri permet de définir les caractères généraux des colonies : la taille (petite ou moyenne ou grande), la forme (régulière ou irrégulière), le contour (net ou lobé ou dentelé), le relief (plat ou hémisphérique ou bombé ou globulaire), la surface (lisse ou rugueuse, humide ou sèche, brillante ou mate), la transparence (opaque ou translucide) et la couleur (blanche, jaune, saumon, rouge, verte, bleue, noire selon la nature de la gélose utilisée).

N.B. : Certains aspects particuliers concernant la couleur peuvent apparaître et révéler des caractères à la fois cultureux et biochimiques (exemple : Sur gélose Héктоen, la présence d'un halo coloré autour d'une colonie est signe de précipitation des sels biliaries, la présence de colonies jaune est signe de dégradation d'un sucre = lactose + et la présence d'un point noir au centre d'une colonie est signe de production d'hydrogène sulfuré = H₂S +) ou cultureux seulement (exemple : Quelque soit la gélose, les colonies présentant une coloration plus foncée au centre sont typiques à *E. coli*).

□ La Technique:

➤ Réaliser une suspension bactérienne à partir d'une colonie d'*E. coli* prélevée de la boîte d'Héktoen et déposée dans 5 ml d'eau physiologique. A partir de cette suspension, effectuer deux types d'ensemencement :

- Ensemencement sur gélose inclinée : (voir technique d'ensemencement par épuisement sur gélose inclinée).
- Ensemencement sur boîte de Pétri : (voir technique d'ensemencement par épuisement sur boîte de Pétri).

On termine en mettant les milieux ensemencés à l'étuve à 35°C pendant 24 heures.

➤ La lecture se fait après 24 heures et met en évidence les caractères généraux suivants :

- Sur gélose inclinée : la gélose de T.S.I. laisse apparaître une culture bactérienne non diffuse dans la gélose (dans la piqûre centrale) et transforme la couleur rouge-orange du milieu en jaune (sur la pente et dans le culot). Les colonies bactériennes envahissent la pente gélosée, et sont blanches, rondes, bombées et brillantes.

- Sur boîte de Pétri :

Sur la gélose Héktoen, la colonie bactérienne d'*E. coli* est en générale : moyenne, régulière, à bordure nette, plate, laisse apparaître en son centre une coloration plus foncée d'où le terme de « centre ombiliqué » et de couleur saumon. Certaines colonies d'*E. coli* sont humides et brillantes alors que d'autres sont sèches et mates.

Sur la gélose nutritive, les colonies d'*E. coli* sont moyennes, rondes, à contour net, régulières, blanches, brillantes, lisses, à centre ombiliqué.

Sur la base des résultats obtenus sur boîtes de Pétri (pour l'étude de la flore fécale et l'étude de *E. coli* O78 et *E. coli* ATCC25922), on réalise le tableau de lecture suivant :

Tableau 24 : Caractères Culturels Des *E. coli* De Laboratoire Et Des *E. coli* Et Autres Bactéries De La Flore Fécale.

Milieux de culture	Gélose Nutritive	Base Gélose au Sang	Gélose Héktoen	Gélose Chapman
<i>E. coli</i> O78 (provenant du laboratoire)				
Caractères culturels	Colonies grandes, rondes, à bord net, au contour lisse et brillant et à centre opaque et foncé, plates, mates, jaunâtres.	Colonies grandes, rondes, à bord net, au contour lisse et brillant et à centre opaque et foncé, plates, mates, blanchâtres.	Colonies grandes, rondes, à bord net, au contour lisse et brillant et à centre opaque et foncé, plates, mates, jaune saumon, lactose positif.	
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (provenant du laboratoire)				
Caractères culturels	Colonies grandes, rondes, à bord net, au	Colonies grandes, rondes, à bord net, au	Colonies grandes, rondes, à bord net,	

Dr. ELAZZAR Nawfel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

	contour lisse et brillant et à centre opaque et foncé, plates, translucides, jaunâtres.	contour lisse et brillant et à centre opaque et foncé, plates, translucides, blanchâtres.	au contour lisse et brillant et à centre opaque et foncé, plates, translucides, jaune saumon, lactose positif.	
<i>E. coli</i> 1 (provenant de la flore fécale)				
Caractères cultureux	Colonies grandes rugueuses, arrondies, à bord légèrement dentelé, plates, mates, opaques, à centre foncé, jaunâtres.	Colonies grandes, rugueuses, arrondies, à bord légèrement dentelé, plates, mates, opaques, à centre foncé, blanchâtre à grisâtre.	Colonies grandes, rugueuses, arrondies, à bord légèrement dentelé, plates, mates, opaques, à centre brun, jaune saumon, lactose positif.	
<i>E. coli</i> 2 (provenant de la flore fécale)				
Caractères cultureux	Colonies grandes, rugueuses, arrondies, à bord légèrement dentelé, plates, translucides, à centre foncé, jaunâtres.	Colonies grandes, rugueuses, arrondies, à bord légèrement dentelé, plates, translucides, à centre foncé, blanchâtre à grisâtre.	Colonies grandes, rugueuses, arrondies, à bord légèrement dentelé, plates, translucides, à centre foncé, jaune saumon, lactose positif.	
<i>E. coli</i> 3 (provenant de la flore fécale)				
Caractères cultureux	Colonies grandes, lisses, rondes, à bord régulier, plates, translucides, à centre foncé, jaunâtres.	Colonies grandes, lisses, rondes, à bord régulier, plates, translucides, à centre foncé, blanchâtres.	Colonies grandes, lisses, rondes, à bord régulier, plates, translucides, à centre foncé, jaune saumon, lactose positif.	
<i>Klebsiella</i> (provenant de la flore fécale)				
Caractères cultureux	Colonies volumineuses, rondes, à bord net, très bombées, surface lisse, opaque, brillantes, muqueuses, blanches.	Colonies volumineuses, rondes, à bord net, très bombées, épaisses, visqueuses, opaques, blanches.	Colonies volumineuses, rondes, à bord net, très bombées, surface lisse, opaque, brillantes, muqueuses, blanches, jaunes, en coulé de miel, lactose positif.	
<i>Proteus</i> (provenant de la flore fécale)				
Caractères cultureux	Colonies petites, légèrement bombées, envahissantes, forme un halo en surface, opaques, blanchâtres.	Colonies petites, envahissantes, forme un voile en surface, blanchâtres.	Colonies petites, légèrement bombées, envahissantes, forme un halo en surface, opaques, vertes à centre noir, lactose négatif.	
<i>B.N.F.</i> (provenant de la flore fécale)				
Caractères cultureux	Colonies petites, rondes, à bord régulier, bombées, brillantes, lisses, translucides, claires.	Colonies petites, rondes, à bord régulier, bombées, brillantes, lisses, translucides, claires.	Colonies petites, rondes, à bord régulier, bombées, brillantes, lisses, translucides, incolores, lactose	

			négatif.	
<i>Staphylocoques (provenant de la flore fécale)</i>				
Caractères cultureux	Colonies très petites, rondes, à contour net, luisantes, bombées, opaques, blanche nacrée ou laiteuses.			Colonies très petites, rondes, régulières, nettes, lisses, bombées, blanches, opaques.

3.3.3 La Recherche Des Caractères Biochimiques:

L'identification biochimique des bactéries repose sur la révélation de certains aspects particulièrement significatifs et stables du métabolisme des familles, genres ou espèces étudiées. Elle se base sur la détermination du métabolisme glucidique (fermentation des sucres...), protidique (dégradation des acides aminés...) et enzymatique (décarboxylase, désaminase, uréase...).

Les caractères biochimiques sont mis en évidence par deux types de galerie : la Galerie biochimique classique (mini galerie) et/ou la galerie API 20 E (possédant 20 test biochimiques miniaturisés).

3.3.3.1 Réalisation d'une mini galerie classique :

Le Principe:

Après identification des caractères morphologique et cultureux, la galerie classique peut prendre un aspect complet (utilisation d'un certain nombre de milieux d'identification) ou réduit (utilisation de quelques milieux d'identification) selon le type de recherche que l'on souhaite faire (identification de la souche d'*E. coli* O78 avec la souche de référence ou identification de la flore fécale y compris *E. coli*).

L'aspect très particulier des colonies d'*Escherichia coli* (colonies plates à centre ombiliqué, de couleur saumon sur milieu Héктоen) réduit le champ de recherche pour l'identification de la souche d'*E. coli* O78 avec la souche de référence, en le limitant à quelques milieux d'identification, tels que :

Milieu Urée-Indole: Ce milieu permet de mettre en évidence la présence d'une uréase (en ajoutant quelques gouttes de réactif Urée-Indole dont la réaction positive se traduit par une alcalinisation du milieu qui vire au rouge violacé) et la production d'indole à partir de la désamination du tryptophane (en ajoutant 24 heures après, quelques gouttes de réactif de Kovacs dont la réaction positive se traduit par l'apparition d'une teinte rouge-cerise au niveau du réactif formant un anneau en surface). (Capet, 1970 b ; Anonyme 5, 1986 e)

- Milieu Clark & Lubs : Ce milieu permet de mettre en évidence la production de l'Acétyl-Méthyl-Carbinol, autrefois appelé acétoïne ou diméthylcétol (en ajoutant 24 heures après, quelques gouttes de réactif de Rouge de Méthyle dont la réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge). (Capet, 1970 a)
- Milieu Citrate de SIMMONS: Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate, considéré comme seule source de carbone. La réaction positive se traduit par un virage au bleu du milieu. (Anonyme 5, 1986 b)
- Milieu de T.S.I.: Ce milieu permet de mettre en évidence l'attaque du glucose, du lactose, du saccharose (l'attaque de l'un des sucres contenu dans le milieu se traduit par une acidification et donc le virage au jaune du rouge phénol, quant à leur utilisation, elle se lit au niveau du culot pour le glucose, et au niveau de la pente pour le lactose et/ou le saccharose); la production de gaz (qui se fait à partir du glucose et se traduit par l'apparition de bulles dans le culot) et la production d'H₂S (qui se traduit par un précipité noir à la jonction de la pente et du culot). (Anonyme 5, 1986 d)
- Milieu Mannitol-Mobilité: Ce milieu permet de mettre en évidence la fermentation du mannitol (par le virage du rouge au jaune) et la mobilité (par une diffusion latérale dans la gélose à partir de la strie verticale d'ensemencement = la piqûre centrale).
- Milieu de Sélénite: Ce milieu d'enrichissement est utilisé pour la recherche des salmonelles. Son utilisation a pour but d'identifier la flore fécale seulement, en recherchant la présence d'éventuelles salmonelles.

Une seconde identification est faite, en réduisant la galerie à cinq milieux (Urée-Indole, Clark & Lubs, Citrate de Simmons, T.S.I. et Mannitol-Mobilité), et concerne l'identification de la flore fécale y compris *E. coli*.

Dans ces deux séries d'identification, on se base surtout sur le virement des couleurs et la production de gaz.

□ La Technique:

➤ Réalisation d'une 1^{ère} mini galerie classique (pour la souche *E. coli* O78 et la souche de référence *E. coli* ATCC 25922) : Réaliser pour chaque souche d'*E. coli*, une suspension bactérienne à partir d'une colonie d'*E. coli*, prélevée d'une boîte d'Héktoen et diluée dans 5 ml d'eau physiologique => Procéder à l'ensemencement des milieux suivants :

- Sur milieu Clark & Lubs, déposer quelques gouttes de la suspension bactérienne d'*E. coli*.
- Sur milieu Citrate de SIMMONS, déposer la suspension bactérienne d'*E. coli* en réalisant des stries sur toute la surface de la gélose inclinée.

- Sur milieu T.S.I., déposer la suspension bactérienne d'*E. coli* en réalisant des stries à la surface de la gélose inclinée et une piqûre centrale. Pour obtenir un résultat correct, il est indispensable de ne pas bloquer la capsule pendant l'incubation.
 - Sur milieu Mannitol, déposer la suspension bactérienne d'*E. coli* en réalisant des stries en spirale à la surface de la gélose, terminées par une piqûre centrale.
 - Sur milieu de Sélénite auquel on a ajouté un disque de Sélénite, déposer quelques gouttes de la suspension bactérienne d'*E. coli*.
 - Le milieu Urée-Indole est représenté par le reste de la suspension bactérienne à laquelle on ajoute le réactif Urée-Indole.
- => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.
- Lecture de la 1^{ère} mini galerie biochimique classique :
- Pour interpréter les résultats obtenus, on se base sur le virement des couleurs en réalisant le tableau de lecture suivant :

Tableau 25 : Tableau De Lecture D'une Mini Galerie Biochimique Classique.

Milieux	Urée-Indole				Clark & Lubs		Citrate de Simmons		T.S.I.		Mannitol-Mobilité		Sélénite F	
	Urée		Indole (anneau)						Pente / Culot					
Couleur d'origine	Orange				Jaune pâle		Vert		Rouge orange		Rouge		jaune	
Couleur finale	Rouge violet	Jaune Orange	Rouge cerise	Jaune	Rouge Rose	clair	Bleu	Vert	Jaune	Rouge	Jaune Orange	Rouge	Rouge	Jaune
Réaction	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

- Les résultats obtenus après 24 heures, de la 1^{ère} mini galerie biochimique classique de la souche *E. coli* O78 et la souche de référence *E. coli* ATCC 25922, sont rassemblés dans le tableau de lecture suivant :

Tableau 26 : Résultats De La 1^{ère} Mini Galerie Biochimique Classique (1)

Milieu Urée-Indole	Milieu Clark & Lubs	Milieu Citrate de Simmons	Milieu de Sélénite + Disque sélénite	Milieu T.S.I.	Milieu Mannitol
Orange	Jaune pâle	Vert	Jaune	Rouge orange	Rouge
Lecture après 24 heures de la souche O78 provenant du laboratoire					
Jaune orange	Clair	Vert	Jaune orange	Jaune	Jaune Orange
+ réactif Kovacs	+ réactif Rouge				

	de Méthyle				
Jaune orange + Anneau Rouge cerise	Rouge	Vert	Jaune orange	Jaune	Jaune Orange
Uréase (-) Indole (+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
Lecture après 24 heures de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 provenant du laboratoire					
Jaune orange	Clair	Vert	Jaune orange	Jaune	Jaune Orange
+ réactif Kovacs	+ réactif Rouge de Méthyle	_____	_____	_____	_____
Jaune orange + Anneau Rouge cerise	Rouge	Vert	Jaune orange	Jaune	Jaune Orange
Uréase (-) Indole (+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)

L'interprétation des couleurs est un peu délicate car ces dernières présentent des nuances lors de leur virement ; de plus, la quantité du réactif ajoutée n'est pas toujours la même (peu ou trop), sans oublier la composition du milieu qui diffère d'un laboratoire à un autre (concentration du colorant).

➤ Réalisation d'une 2^{ème} mini galerie classique (pour la flore fécale y compris *E. coli* provenant de l'élevage expérimental) : Réaliser pour chaque souche bactérienne, une suspension bactérienne à partir d'une colonie prélevée d'une boîte d'Héktoen et diluée dans 5 ml d'eau physiologique => Procéder à l'ensemencement des milieux suivants :

- Sur milieu Clark & Lubs, déposer quelques gouttes de la suspension bactérienne.
- Sur milieu Citrate de SIMMONS, déposer la suspension bactérienne en réalisant des stries sur toute la surface de la gélose inclinée.
- Sur milieu T.S.I., déposer la suspension bactérienne en réalisant des stries à la surface de la gélose inclinée et une piqûre centrale. Pour obtenir un résultat correct, il est indispensable de ne pas bloquer la capsule pendant l'incubation.
- Sur milieu Mannitol, déposer la suspension bactérienne en réalisant des stries en spirale à la surface de la gélose terminées par une piqûre centrale.
- Le milieu Urée-Indole est représenté par le reste de la suspension bactérienne à laquelle on ajoute le réactif Urée-Indole.

=> Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

➤ Lecture de la 2^{ème} mini galerie biochimique classique : Pour interpréter les résultats obtenus, on se réfère au tableau de lecture basé sur le virement des couleurs décrit précédemment. Les

résultats obtenus de la 2^{ème} mini galerie biochimique classique, pour la flore fécale y compris *E.coli* provenant de l'élevage expérimental, sont rassemblés dans le tableau de lecture suivant :

Tableau 27 : Résultats De La 2^{ème} Mini Galerie Biochimique Classique.

Milieux	Urée -Indole		Clark & Lubs	Citrate de Simmons	TSI			Mannitol - Mobilité	
	Urée	Indole			Pente	Culot	Gaz	Mannitol	Mobilité
Flore fécale prélevée <u>avant inoculation</u>									
<i>E. coli</i>	Jaune	Rouge	Clair	Vert	Jaune	Jaune	Présence	Jaune	Immobile
	-	+	-	-	+	+	+	+	-
	Jaune	Rouge	Rose	Vert	Jaune	Jaune	Présence	Jaune	Immobile
	-	+	+	-	+	+	+	+	-
	Jaune	Rouge	Clair	Vert	Rouge	Jaune	Absence	Jaune	Immobile
	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	Jaune	Rouge	Rose	Vert	Jaune	Jaune	Absence	Jaune	Immobile
<i>Klebsiella</i>	Rouge	Jaune	Clair	Bleu	Jaune	Jaune	Présence	Jaune	Immobile
	+	-	-	+	+	+	+	+	-
	Rouge	Rouge	Clair	Bleu	Jaune	Jaune	Présence	Jaune	Immobile
	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	Rouge	Jaune	Rose	Bleu	Jaune	Jaune	Présence	Jaune	Immobile
	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Proteus</i>	Rouge	Jaune	Clair	Vert	Rouge violet	Rouge violet	Présence	Rouge	mobile
	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	Rouge	Jaune	Clair	Vert	Rouge	Rouge	Absence	Rouge	mobile

					violet	violet			
	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Rouge	Rouge	Clair	Vert	Rouge violet	Rouge violet	Absence	Rouge	mobile
	+	+	-	-	-	-	-	-	+
B.N.F.	Jaune	Jaune	Clair	Vert	Rouge	Rouge orange	Absence	Rouge	Immobile
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> prélevé après inoculation									
<i>E. coli</i>	Jaune Orange	Rouge	Rouge	Vert	Jaune	Jaune	Présence	Jaune orange	Immobile
	-	+	+	-	+	+	+	+	-
	Jaune Orange	Rouge	Clair	Vert	Jaune	Jaune	Absence	Jaune orange	Immobile
	-	+	-	-	+	+	-	+	-

- Ces résultats sont comparés avec ceux de la 1^{ère} mini galerie (2):

Tableau 28 : Résultats De La 1^{ère} Mini Galerie Biochimique Classique (2).

Milieux	Urée –Indole		Clark & Lubs	Citrate de Simmons	TSI			Mannitol – Mobilité	
	Urée	Indole			Pente	Culot	Gaz	Mannitol	Mobilité
<i>E. coli</i> provenant du laboratoire									
O78	Jaune Orange	Rouge	Rouge	Vert	Jaune	Jaune	Présence	Jaune orange	Immobile
	-	+	+	-	+	+	+	+	-
ATCC 25922	Jaune Orange	Rouge	Rouge	Vert	Jaune	Jaune	Absence	Jaune orange	Immobile
	-	+	+	-	+	+	-	+	-

- Selon Pilet *et al.*, 1979, on peut effectuer une orientation rapide d'un diagnostic d'entérobactéries en se basant sur les caractères suivants :

Tableau 29 : Petit Diagnostic Biochimique Rapide De Quelques Entérobactéries.

UREE	Négative	INDOLE	Négative	<i>Klebsiella</i>
-------------	----------	---------------	----------	--------------------------

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

		Positive	<i>Escherichia coli</i>	
	Positive	INDOLE	Négative	<i>Klebsiella pneumoniae / Proteus mirabilis</i>
			Positive	<i>Klebsiella oxytoca / Proteus vulgaris</i>

➤ Résultats de la galerie biochimique (cf. tableaux ci-dessous) :

Tableau 30 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J-4

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
1	J-4 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
		Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella oxytoca</i>
		Lac (-) / H ₂ S (+)	Hektoen	<i>Proteus vulgaris</i>
		Mannitol (-)	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
a	J-4 B (1/5)	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
b	J-4 C (1/10)	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

En dehors des trois sujets de l'essai expérimental, les prélèvements effectués avant l'inoculation (J0) proviennent d'un sujet pris au hasard, et qui est considéré comme témoin négatif (car non inoculé et non traité).

Tableau 31: Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J-3

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
2	J-3 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
		Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
c	J-3 B (1/5)	Lac (-) / H ₂ S (+)	Hektoen	<i>Proteus vulgaris</i>
		Mannitol (-)	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
		Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
d	J-2 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
		Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
		Lac (-) / H ₂ S (+)	Hektoen	<i>Proteus mirabilis</i>
		Mannitol (-)	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
e	J-2 C (1/10)	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

En dehors des trois sujets de l'essai expérimental, les prélèvements effectués avant l'inoculation (J0) proviennent d'un sujet pris au hasard, et qui est considéré comme témoin négatif (car non inoculé et non traité).

Tableau 33: Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J-1

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
4	J-1 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
		Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		Lac (-) / H ₂ S (+)	Hektoen	<i>Proteus vulgaris</i>
		Mannitol (-)	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
f	J-1 C (1/10)	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

En dehors des trois sujets de l'essai expérimental, les prélèvements effectués avant l'inoculation (J0) proviennent d'un sujet pris au hasard, et qui est considéré comme témoin négatif (car non inoculé et non traité).

Tableau 34 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J0

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
5	J0 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
6	J0 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
7	J0 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
8	J0 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
9	J0 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
10	J0 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 35 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J1

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
11	J1 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
12	J1 FL03+	Lac (-) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Bacille Non-Fermenter</i>
13	J1 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
14	J1 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
15	J1 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
16	J1 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 36 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J2

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
17	J2 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
18	J2 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
19	J2 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
20	J2 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
21	J2 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
22	J2 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
23	J2 FL03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
24	J2 FL24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
25	J2 EN03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
26	J2 EN24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 37 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J3

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
27	J3 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
28	J3 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
29	J3 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
30	J3 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
31	J3 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
32	J3 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
33	J3 FL03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
34	J3 FL24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
35	J3 EN03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
36	J3 EN24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 38 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J4

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
37	J4 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
38	J4 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
39	J4 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
40	J4 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
41	J4 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
42	J4 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
43	J4 FL03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
44	J4 FL24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
45	J4 EN03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
46	J4 EN24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 39 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J5

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
47	J5 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
48	J5 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
49	J5 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
50	J5 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
51	J5 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
52	J5 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
53	J5 FL03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
54	J5 FL24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
55	J5 EN03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
56	J5 EN24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 40 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J6

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
57	J6 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
58	J6 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
59	J6 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
60	J6 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
61	J6 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
62	J6 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
63	J6 FL03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
64	J6 FL24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
65	J6 EN03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
66	J6 EN24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 41 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J7

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
67	J7 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
68	J7 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
69	J7 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
70	J7 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
71	J7 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
72	J7 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
73	J7 FL03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
74	J7 FL24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
75	J7 EN03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
76	J7 EN24-	Lac (+) / H ₂ S	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

Tableau 42 : Résultats De La Galerie Biochimique A Partir Des Prélèvements Effectués A J8

N°	Code	Type de colonies	Milieu de culture	Identification
77	J8 T+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
78	J8 FL03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
79	J8 FL24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
80	J8 EN03+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
81	J8 EN24+	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
82	J8 T-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
83	J8 FL03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
84	J8 FL24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Klebsiella</i>
85	J8 EN03-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>
86	J8 EN24-	Lac (+) / H ₂ S (-)	Hektoen	<i>Escherichia coli</i>

La galerie biochimique est réalisée à partir des colonies de type Lac (+) prélevées sur le milieu de culture Hektoen.

(cf. Annexe 18 et 19).

Après identification de la flore fécale, on ne garde que les milieux de T.S.I. correspondant à la souche d'*Escherichia coli* pour la suite des manipulations à effectuer.

3.3.3.2 Réalisation de la galerie API 20 E :

□ Le Principe:

Elle nous permet d'établir une identification plus complète et plus sûre à partir du profil numérique dont l'interprétation se base sur les données du Catalogue Analytique.

□ La Technique:

➤Réalisation de la galerie API 20 E de la souche *E. coli* (O78): Prendre 1 colonie d'*E. coli* (O78) et la mettre dans un tube de 10 ml d'eau physiologique pour réaliser la suspension bactérienne => Prélever une quantité de cette suspension avec une pipette Pasteur et remplir les 20 cupules de la galerie API 20 E de quelques gouttes chacune (renouveler l'opération si nécessaire) => les cupules presque encadrées (□) doivent être remplies jusqu'en haut de la suspension bactérienne et les cupules soulignées (__) doivent être couvertes d'huile de vaseline stérile (milieux en anaérobiose) => Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

Tableau 43 : Manipulations Particulières Sur Certaines Cupules De La Galerie API 20 E Avant Incubation.

Manipulations particulières	Cupules de la Galerie API 20 E
Remplir jusqu'en haut les cupules presque encadrées (□)	CIT - VP - GEL
Couvrir d'huile de vaseline stérile les cupules soulignées (__)	ADH - LDC - ODC - H2S - URE

➤ Lecture de la galerie API 20 E après 24 heures:

- Avant la lecture, ajouter les réactifs TDA, KOVACS, VP I + VP II pour les cupules TDA, IND, VP respectivement (cf. tableau ci-dessous).

Tableau 44 : Manipulations Particulières Sur Certaines Cupules De La Galerie API 20 E Après Incubation.

<u>Réactifs additionnés</u>	Cupules de la Galerie API 20 E
<u>TDA</u>	TDA
<u>KOVACS</u>	IND
<u>VP I + VP II</u>	VP

- Pour interpréter les résultats obtenus, on se repose sur le tableau de lecture suivant (qui se base sur les couleurs) :

Tableau 45 : Tableau De Lecture De La Galerie API 20 E.

Tests	Composants actifs	QTE (mg/cup.)	Réactions / Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif

ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0.223	B-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge / orangé
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DéCarboxylase	Jaune	Rouge / orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	Rouge / orangé
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0.756	utilisation du CITrate	Vert pâle / jaune	Bleu-vert / bleu
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0.075	production d'H ₂ S	Incolore / grisâtre	Dépôt noir / fin liseré
<u>URE</u>	urée	0.76	UREase	Jaune	Rouge / orangé
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DésAminase	TDA / immédiat	
				Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0.19	production d'INDole	JAMES / immédiat	
				Incolore Vert pâle / jaune	Rose
VP	sodium pyruvate	1.9	Production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				Incolore	Rose / rouge
<u>GEL</u>	gélatine (origine bovine)	0.6	Gélatinase (GELatine)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxydation (GLUCose)	Bleu / bleu-vert	Jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxydation (MANnitrol)	Bleu / bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	1.9	fermentation / oxydation (INOSitol)	Bleu / bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxydation (SORbitol)	Bleu / bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxydation (RHAMnose)	Bleu / bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	1.9	fermentation / oxydation (SACcharose)	Bleu / bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxydation (MELibiose)	Bleu / bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	0.57	fermentation / oxydation (AMYgdaline)	Bleu / bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxydation (ARABinose)	Bleu / bleu-vert	Jaune
OX	(Voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(Voir notice du test oxydase)	

(Anonyme 2, 2002)

- On réalise dans un premier temps la galerie API 20 E de la souche O78 (in vitro) pour définir son profil numérique. Après 24 heures, on obtient les résultats suivants:

Tableau 46 : Résultats De La Galerie API 20 E De La Souche O78 (In Vitro).

ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CIT</u>	<u>H₂S</u>	<u>URE</u>	TDA	IND	VP	<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5		1			4			4			5			7			2		

Après le changement de couleurs des cupules et le nombre de points calculés pour chaque série de trois cupules, on obtient le **profil numérique** suivant : **5144572** qui correspond à : une

E. coli 1 : % id=96.5 T=0.97 => Bonne identification d'après le CATALOGUE ANALYTIQUE API 20 E, BIOMERIEUX S.A. (Anonyme 1, 1994)

Ces résultats sont également confirmés par le **pourcentage de réactions positives après 18-24 / 48 heures à 36°C +/- 2°C** retrouvé sur le **tableau d'identification** de la notice technique : les pourcentages concernant *Escherichia coli* 1 rejoignent les résultats obtenus (réactions positives) par la galerie API 20 E de la souche **O78**.

Tableau 47 : Le Pourcentage De Réactions Positives De *Escherichia coli* 1.

API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Escherichia coli 1	90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99

(Anonyme 2, 2002)

Après identification sérologique de la souche O78 (in vivo) réalisées en deux séries de sérotypage (dont la 1^{ère} comprend les souches O78 numéro : 20, 28, 29, 30, 31, 39, 40, 41, 48, 51, 59, 71 ; et la 2^{ème} comprend les souches O78 numéro : c, f, 11, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77) et réalisation de leur galerie API 20 E, on obtient les résultats suivants :

➤ Lecture de la galerie API 20 E de la 1^{ère} série de sérotypage après 24 heures:

Tableau 48 : Résultats De La Galerie API 20 E De La 1^{ère} Série De Sérotypage

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5		1			4			4		5			7			2			

➤ Lecture de la galerie API 20 E de la 2^{ème} série de sérotypage après 24 heures:

Tableau 49 : Résultats De La Galerie API 20 E De La 2^{ème} Série De Sérotypage

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5		1			4			4		5			7			2			

On réalise dans un troisième temps, la galerie API 20 E de la souche de référence (ATCC 25922), de la souche O78 (in vitro) et de la souche saprophyte (avant inoculation) pour une étude comparative. Après 24 heures, on obtient les résultats suivants:

➤ Lecture de la galerie API 20 E de 3 souches d'*E. coli*:

Tableau 50 : Lecture Comparative Des Résultats De La Galerie API 20 E De 3 Souches D'*E. coli*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Galerie API 20 E pour la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922																			
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
5			1			4			4			5			5			2	
Galerie API 20 E pour la souche O78 (in vitro)																			
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5			1			4			4			5			7			2	
Galerie API 20 E pour la souche <i>E. coli</i> saprophyte (avant inoculation)																			
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5			1			4			4			5			7			2	

Remarque : Le **Profil numérique** est identique pour la souche O78 et la souche *E. coli* saprophyte => il s'agit bien de la souche *Escherichia coli* 1 (qu'elle soit saprophyte ou pathogène). Concernant la souche de référence, son profil numérique correspond à celui rapporté par la littérature (Se référer à la notice du système API 20 E : 07584D-FR-2002/10, p. 1).

3.3.4 La Recherche Des Caractères Antigéniques:

□ Le Principe:

Le but de cette recherche n'est pas d'étudier les caractères antigénique des souches d'*Escherichia coli* prélevées, mais de retrouver en eux les caractères antigéniques de la souche inoculée O78:K80 (par le test d'agglutination sur lame avec le sérum spécifique à la souche O78:K80), pour confirmer la présence ou l'absence de cette souche pathogène dans les prélèvements provenant des sujets expérimentaux inoculés, et pouvoir rechercher par la suite chez cette dernière l'existence ou non d'une antibiorésistance aux quinolones.

Nous allons tout d'abord procéder à la vérification du test sérologique sur les deux souches d'*Escherichia coli* (pathogène et saprophyte) avant de réaliser le test d'agglutination sur lame avec le sérum spécifique à la souche O78:K80.

➤ **Vérification du test sérologique** sur les deux souches d'*Escherichia coli* (pathogène et saprophyte). Ce test témoin (ou test de contrôle) a pour but de vérifier l'absence d'auto-agglutination pour s'assurer de la fiabilité des résultats du test d'agglutination sur lame avec le sérum spécifique et est réalisé en deux étapes:

➤ **1^{ère} étape : Le test d'auto-agglutination avec l'eau physiologique :**

- Pour la souche pathogène (O78), on peut obtenir:
 - => Agglutination immédiate => présence d'auto-agglutination
 - => Pas d'agglutination => absence d'auto-agglutination
- Pour la souche saprophyte (*E. coli* avant inoculation), on peut obtenir:
 - => Agglutination immédiate => présence d'auto-agglutination
 - => Pas d'agglutination => absence d'auto-agglutination

➤ **2^{ème} étape : Le test d'agglutination sur lame avec le sérum spécifique à la souche O78:K80 :**

- Pour la souche pathogène (O78), on peut obtenir:
 - => Agglutination immédiate => il s'agit bien de la souche O78:K80.
 - => Pas d'agglutination => il ne s'agit pas de la souche O78:K80.
- Pour la souche saprophyte (*E. coli* avant inoculation), on peut obtenir:
 - => Agglutination immédiate => il s'agit d'une souche *E.coli* auto-agglutinante (confirmée au préalable par le test d'auto agglutination).
 - => Pas d'agglutination => il s'agit bien d'une souche *E.coli*.

➤ **Réalisation du test sérologique** (test d'agglutination sur lame avec le sérum spécifique à la souche O78:K80) sur les souches d'*Escherichia coli* (pathogène et saprophyte): deux possibilités sont à envisager :

- => Agglutination immédiate => il s'agit bien de la souche O78:K80 inoculée.
- => Pas d'agglutination => il s'agit d'une souche *E.coli*.

□ **La Technique:**

➤ **Vérification du test sérologique** sur les deux souches d'*Escherichia coli* (pathogène et saprophyte). Elle est réalisée en deux étapes:

➤ **1^{ère} étape : Le test d'auto-agglutination avec l'eau physiologique :**

- Pour la souche pathogène (O78): Sur une lame de verre propre, mettre une goutte d'eau physiologique et une goutte de la suspension bactérienne de O78. Mélanger les deux gouttes et

bien les étaler sur la lame. Imprimer à la lame un mouvement de rotation tout en l'inclinant vers le bas puis vers le haut de façon continue pendant quelques secondes, pour rechercher la trace de filaments ou petits grumeaux, signes d'une agglutination. => Pas d'auto-agglutination.

□ Pour la souche saprophyte (*E. coli* avant inoculation): Sur une lame de verre propre, mettre une goutte d'eau physiologique et une goutte de la suspension bactérienne de *E. coli*. Mélanger les deux gouttes et bien les étaler sur la lame. Imprimer à la lame un mouvement de rotation tout en l'inclinant vers le bas puis vers le haut de façon continue pendant quelques secondes pour rechercher la trace de filaments ou petits grumeaux, signes d'une agglutination. => Pas d'auto-agglutination.

➤ **2^{ème} étape : Le test d'agglutination sur lame avec le sérum spécifique à la souche O78:K80 :**

□ Pour la souche pathogène (O78): Sur une lame de verre propre, mettre une goutte de sérum spécifique et une goutte de la suspension bactérienne de O78. Mélanger les deux gouttes et bien les étaler sur la lame. Imprimer à la lame un mouvement de rotation tout en l'inclinant vers le bas puis vers le haut de façon continue pendant quelques secondes pour rechercher la trace de filaments ou petits grumeaux, signes d'une agglutination. => Agglutination immédiate => il s'agit bien de la souche O78:K80.

□ Pour la souche saprophyte (*E. coli* avant inoculation): Sur une lame de verre propre, mettre une goutte de sérum spécifique et une goutte de la suspension bactérienne de *E. coli*. Mélanger les deux gouttes et bien les étaler sur la lame. Imprimer à la lame un mouvement de rotation tout en l'inclinant vers le bas puis vers le haut de façon continue pendant quelques secondes pour rechercher la trace de filaments ou petits grumeaux, signes d'une agglutination. => Pas d'agglutination => il s'agit d'une souche *E. coli*.

➤ **Réalisation du test sérologique (test d'agglutination sur lame avec le sérum spécifique à la souche O78:K80) sur les souches d'*Escherichia coli* (supposées pathogènes ou saprophytes):** Pour chaque souche d'*E. coli* (supposée pathogène ou saprophyte) procéder à la même préparation. Préparer une suspension bactérienne à partir d'une colonie d'*E. coli* prélevée sur Héктоen (ensemencé la veille) et la mettre dans 5ml d'eau physiologique. Sur une lame de verre propre, mettre une goutte de sérum spécifique et une goutte de la suspension bactérienne de *E. coli*. Mélanger les deux gouttes et bien les étaler sur la lame. Imprimer à la lame un mouvement de rotation tout en l'inclinant vers le bas puis vers le haut de façon continue pendant

quelques secondes pour rechercher la trace de filaments ou petits grumeaux, signes d'une agglutination :

=> Agglutination immédiate => il s'agit bien de la souche O78:K80 inoculée.

=> Pas d'agglutination => il s'agit d'une souche *E.coli*.

Concernant les souches d'*E. coli* supposées pathogènes, ce sont des souches provenant des prélèvements effectués sur des sujets inoculés et traités et des sujets inoculés et non traités (témoins positifs) ; alors que les souches d'*E. coli* supposées saprophytes, proviennent des prélèvements effectués sur des sujets non inoculés et non traités (témoins négatifs). La présence d'agglutination révèle la présence d'une souche pathogène (O78), par contre l'absence d'agglutination révèle la présence d'une souche saprophyte, ainsi que l'absence d'une éventuelle contamination des sujets servant de témoins négatifs par les sujets inoculés.

NB : On peut également travailler à partir des colonies d'*E. coli* (supposées pathogènes ou saprophytes) prélevées sur milieu T.S.I.

➤ Résultats du test sérologique sur les souches d'*E. coli* isolées : (cf. tableaux de lecture suivants, sur les sérotypages réalisés)

Tableau 51 : Sérotypage des *E. coli* provenant des sujets inoculés et traités

(FL03+, FL24+, EN03+, EN24+)

<i>E. coli</i> N° :	Type sérologique de <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> N° :	Type sérologique de <i>E. coli</i>
6	<i>E. coli</i>	40	O78
7	<i>E. coli</i>	41	O78
8	<i>E. coli</i>	48	O78
9	<i>E. coli</i>	49	<i>E. coli</i>
14	<i>E. coli</i>	50	<i>E. coli</i>
15	<i>E. coli</i>	51	O78
19	<i>E. coli</i>	58	<i>E. coli</i>

Dr LEZZAR Newel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

20	O78	59	O78
21	<i>E. coli</i>	60	<i>E. coli</i>
28	O78	68	<i>E. coli</i>
29	O78	69	<i>E. coli</i>
30	O78	71	O78
31	O78	79	<i>E. coli</i>
38	<i>E. coli</i>	80	<i>E. coli</i>
39	O78	81	<i>E. coli</i>

Tableau 52 : Sérotypage des *E. coli* provenant des sujets (T+), (T-) et de l'essai expérimental

<i>E. coli</i> N° :	Type sérologique de <i>E. coli</i>
Sérotypage des <i>E. coli</i> provenant des sujets inoculés et non traités (T+)	
5	<i>E. coli</i>
11	O78
17	O78
27	O78
37	O78
47	O78

57	O78
67	O78
77	O78
Sérotypage des <i>E. coli</i> provenant des sujets de l'essai expérimental	
a	<i>E. coli</i>
b	<i>E. coli</i>
c	O78
d	<i>E. coli</i>
e	<i>E. coli</i>
f	O78
Sérotypage des <i>E. coli</i> provenant des sujets non inoculés et non traités (T-)	
10	<i>E. coli</i>
16	<i>E. coli</i>
22	<i>E. coli</i>
32	<i>E. coli</i>
42	<i>E. coli</i>
52	<i>E. coli</i>
62	<i>E. coli</i>
72	<i>E. coli</i>
82	<i>E. coli</i>

Remarque : Pas de contamination des sujets non inoculés et non traités (T-) par la souche pathogène.

(cf. Annexe 20 et 21)

3.4 LES MANIPULATIONS DE CONSERVATION

Le Principe:

Avant de conserver une souche bactérienne, il faut s'assurer de la pureté de la culture à partir de laquelle on effectuera notre prélèvement bactérien. Pour ce faire, on réalise un repiquage, soit dans un milieu d'enrichissement puis dans un milieu de culture, soit directement dans un milieu de culture duquel on prélèvera la colonie à conserver.

La Technique:

Prélever 1 colonie de la souche O78 à partir d'une culture pure puis réaliser, dans un tube de conservation (BIO-RAD), un étalement en spirale à la surface de la gélose de conservation et terminer par une piqûre centrale.

3.5 LES MANIPULATIONS POUR LA REALISATION DE L'ANTIBIOGRAMME

En raison de l'augmentation de la fréquence de souches résistantes à un ou plusieurs antibiotiques, il est souhaitable de vérifier l'antibiorésistance de la souche O78 (in vitro) avant de l'inoculer. On réalisera par la suite un antibiogramme pour rechercher une éventuelle résistance aux quinolones des souches d'*Escherichia coli* (y compris la O78) prélevées de la flore fécale du poulet de chair (in vivo).

De plus, l'utilisation d'une souche de référence (*E. coli* ATCC 25922) aide à l'interprétation des résultats et permet un contrôle de qualité interne dans le laboratoire.

□ Le Principe:

L'antibiogramme consiste à appliquer sur une gélose spécifique (Mueller-Hinton) des disques imprégnés de différents antibiotiques (d'une même famille telle que les Quinolones, ou de familles d'antibiotiques différentes telles que les Quinolones, les B-lactamines, les Aminocyclitolides, les Tétracyclines, les Polypeptides, les Phénicolés et les Sulfamides) afin de rechercher la résistance ou la sensibilité de la souche bactérienne (*E. coli*) envers ces antibiotiques.

Tableau 53 : Liste des antibiotiques testés et les familles d'antibiotiques correspondantes

Antibiotiques Testes	Familles D'Antibiotiques
Acide Nalidixique	Quinolones
Amikacine	Aminosides
Amoxicilline + Acide Clavulanique	B-Lactamines
Aztréonam	B-Lactamines
Céfalotine	B-Lactamines

Céfepime	B-Lactamines
Céfotaxime	B-Lactamines
Céfoxitine	B-Lactamines
Céftazidime	B-Lactamines
Chloramphénicol	Phénicolés
Ciprofloxacine	Quinolones
Colistine	Polypeptides
Fluméquine	Quinolones
Gentamicine	Aminosides
Imipénèm	B-Lactamines
Kanamycine	Aminosides
Minocycline	Tetracyclines
Nétilmicine	Aminosides
Norfloxacine	Quinolones
Péfloxacine	Quinolones
Pipéracilline	B-Lactamines
Streptomycine	Aminosides
Tétracycline	Tétracyclines
Ticarcilline	B-Lactamines
Tobramycine	Aminosides
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	Sulfamides

(Maur, 1990 c)

□ La Technique:

La méthode la plus utilisée est celle de la diffusion sur gélose. Elle consiste à déposer des disques antibiotiques sur un milieu gélosée de Mueller-Hinton,ensemencé avec la souche isolée (souche à étudier).

➤ Réalisation de l'antibiogramme d'*E.coli*: Décharger dans 5ml d'eau physiologique, quelques colonies d'*E.coli* (souche de référence *E. coli* ATCC 25922, O78 du laboratoire, O78 de la flore fécale, *E. coli* de la flore fécale) prélevées sur une boîte d'Héktoen ou de G.N. (ensemencées la veille) pour obtenir une suspension bactérienne. Faire passer cette suspension bactérienne par

l'agitateur pour bien l'homogénéiser. Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. L'essorer en le pressant fermement tout en le tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Sur une boîte de Mueller-Hinton sèche, Faire un étalement en frottant l'écouvillon en stries serrées, de haut en bas, couvrant ainsi la totalité de la surface gélosée. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide du distributeur à disques. Appuyer légèrement sur les disques à l'aide d'une pince anatomique stérile. Mettre à l'étuve à 35°C pendant 24 h.

Remarque: Renouveler cette technique pour chaque série d'antibiogramme (pour chaque souche d'*E. coli* et pour chaque famille d'antibiotiques).

➤ Lecture de l'antibiogramme: Pour chaque boîte de Mueller-Hinton, mesurer avec précision, les diamètres des zones d'inhibition. L'interprétation de l'antibiogramme se fait comme suit :

➤ Pour la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 : Comparer les résultats obtenus aux valeurs limites fournies, pour la souche de référence *E. coli* ATCC 25922, par l'OMS dans les documents intitulés : Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Vétérinaire & Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Humaine Et Antibiogramme Pasteur pour le contrôle de qualité. On réalise le tableau de lecture suivant :

Tableau 54 : Tableau De Lecture De L'Antibiogramme De La Souche De Référence
E. coli ATCC 25922

Antibiotiques testés	Code de l'antibiotique	Charges des disques (µg)	Diamètres limites (mm)	Documents utilisés
Acide Nalidixique	NA	30	23-28	(1).
Amikacine	AN	30	19-26	(1), (2).
Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	20/10	18-24	(2), (3), (4)
Aztréonam	ATM	30	28-36	(2).
Céfalotine	CF	30	18-23	(1).
Céfotaxime	CTX	30	29-35	(2).

Céfoxitine	FOX	30	23-29	(1), (2).
Céftazidime	CAZ	30	25-32	(2).
Chloramphénicol	C	30	21-27	(1), (2), (3), (4).
Ciprofloxacine	CIP	5	30-40	(2).
Colistine	CS	10	11-15	(3), (4).
Gentamicine	GM	10	19-26	(1), (2), (3), (4).
Imipénèm	IPM	10	26-32	(2).
Kanamycine	K	30	17-25	(1), (2).
Pipéracilline	PIP	100	24-30	(2).
Streptomycine	S	10	19-20	(1).
Tétracycline	TE	30	18-25	(1), (2), (3).
Ticarcilline	TIC	75	24-30	(2).
Tobramycine	TM	10	18-26	(1), (2).
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	SXT	1.25/23.75	23-29	(2), (3).

(1): Anonyme 6, 1985.

(2): Anonyme 7, 2003 (b).

(3): Anonyme 8, 2003 (b).

(4) : Anonyme 9, 2005 (b).

- Pour les souches d'*E. coli* (O78 et autres *E. coli*) : Sur la base des documents précédents ainsi que du Classeur Biomerieux et du logiciel WHONET, on a établi le tableau de lecture qui suit, pour classer la bactérie d'*E. coli* (pathogène et saprophyte) dans l'une des catégories suivantes : Sensible, Intermédiaire, ou Résistante.

Tableau 55 : Tableau De Lecture De L'Antibiogramme Des Enterobactéries.

Antibiotiques testés	Code de l'antibiotique	Charges des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)			Documents utilisés
			Résistant	Intermédiaire	Sensible	
Acide Nalidixique	NA	30	≤13	14-18	≥19	(1), (4), (5).
Amikacine	AN	30	≤14	15-16	≥17	(2), (5).
Amoxicilline	AMX	10	≤14	15-20	≥21	(4)
Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	20/10	≤13	14-17	≥18	(2), (3), (4), (5).
Aztréonam	ATM	30	≤15	16-21	≥22	(5).
Céfalotine	CF	30	≤14	15-17	≥18	(3), (5).
Céfepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18	(5).

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

Céfotaxime	CTX	30	≤14	15-22	≥23	(2), (5).
Céfoxitine	FOX	30	≤14	15-17	≥18	(2), (5).
Céftazidime	CAZ	30	≤14	15-17	≥18	(5).
Chloramphénicol	C	30	≤12	13-17	≥18	(3), (4), (5).
Ciprofloxacine	CIP	5	≤15	16-20	≥21	(5).
Colistine	CS	10	≤8	9-10	≥11	(3).
Fluméquine	UB	30	≤20	21-24	≥25	(3), (4).
Gentamicine	GM	10	≤12	13-14	≥15	(2), (3), (4), (5).
Imipénèm	IPM	10	≤13	14-15	≥16	(2), (5).
Kanamycine	K	30	≤13	14-17	≥18	(5).
Minocycline	MNO	30	≤14	15-18	≥19	(5).
Nétilmicine	NET	30	≤12	13-14	≥15	(5).
Norfloxacine	NOR	10	≤12	13-16	≥17	(4), (5).
Péfloxacine	PEF	5	≤15	16-21	≥22	(1).
Pipéracilline	PIP	100	≤17	18-20	≥21	(5).
Streptomycine	S	10	≤11	12-14	≥15	(3), (4), (5).
Tétracycline	TE	30	≤14	15-18	≥19	(3), (4), (5).
Ticarcilline	TIC	75	≤14	15-19	≥20	(5).
Tobramycine	TM	10	≤12	13-14	≥15	(5).
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	SXT	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16	(2), (3), (4), (5).

(1): Anonyme 5, 1986 (f).

(2): Anonyme 7, 2003 (a) ; Anonyme 7, 2003 (c).

(3): Anonyme 8, 2003 (a) ; Anonyme 8, 2003 (c).

(4): Anonyme 9, 2005 (a) ; Anonyme 9, 2005 (c).

(5): Anonyme 10, 2003.

➤ Résultats des différents antibiogrammes réalisés (se référer aux deux tableaux de lecture de l'antibiogramme précédents pour l'interprétation des diamètres d'inhibition) :

➤ Lecture de l'Antibiogramme de la souche O78 (in vitro) à différents antibiotiques:

Tableau 56 : Résultats De L'antibiogramme De La Souche O78 (in vitro)

A Différents Antibiotiques

<u>BOITES</u>	<u>ANTIBIOTIQUES TESTES</u>	<u>Diamètre d'inhibition</u> (mm)	<u>Interprétation</u> (S / I / R)
---------------	-----------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

<u>Boite 1 :</u>	CTX : CEFOTAXIME	35	(S)
	FOX : CEFOXITINE	25	(S)
	CAZ : CEFTAZIDIME	29	(S)
	FEP : CEFEPIME	33	(S)
	ATM : AZTREONAM	34	(S)
	AMC : AMOXICILLINE+ACIDE CLAVULANIQUE	18	(S)
N.B.: AMC : AMOXICILLINE + ACIDE CLAVULANIQUE = AUGMENTIN.			
<u>Boite 2 :</u>	TM : TOBRAMYCINE	27	(S)
	NET : NETILMICINE	32	(S)
	AN : AMIKACINE	27	(S)
	S : STREPTOMYCINE	23	(S)
	K : KANAMYCINE	27	(S)
	GM : GENTAMICINE	30	(S)
<u>Boite 3 :</u>	C : CHLORAMPHENICOL	26	(S)
	SXT : TRIMETHOPRIME+SULFAMETHOXAZOLE	26	(S)
	UB : FLUMEQUINE	31	(S)
	NOR : NORFLOXACINE	32	(S)
	PEF : PEFLOXACINE	30	(S)
	NA : ACIDE NALIDIXIQUE	24	(S)
	CIP : CIPROFLOXACINE	36	(S)
N.B.: SXT: TRIMETHOPRIME + SULFAMETHOXAZOLE = BACTRIME.			
<u>Boite 4 :</u>	CF : CEFALOTINE	22	(S)
	PIP : PIPERACILLINE	31	(S)
	CTX : CEFOTAXIME	35	(S)
	FOX : CEFOXITINE	25	(S)
	TIC : TICARCILLINE	32	(S)
	AMX : AMOXICILLINE	22	(S)
<u>Boite 5 :</u>	IPM : IMIPENEM	30	(S)
	MNO : MINOCYCLINE	14	(R)

	TE : TETRACYCLINE	17	(I)
	CS : COLISTINE	21	(S)

N.B.: (S): SENSIBLE / (I): INTERMEDIAIRE / (R): RESISTANT.

➤ Lecture de l'Antibiogramme de la souche de référence (*E.coli* ATCC 25922) à différents antibiotiques:

Tableau 57 : Résultats De L'antibiogramme De La Souche De Référence (*E.coli* ATCC 25922) A Différents Antibiotiques

<u>BOITES</u>	<u>ANTIBIOTIQUES TESTES</u>	<u>Diamètre d'inhibition (mm)</u>	<u>Interprétation (0, +/-1, +/-2)</u>
<u>Boite 1:</u>	S : STREPTOMYCINE	18	-1
	K : KANAMYCINE	21	0
	GM : GENTAMICINE	28	+2
	TM : TOBRAMYCINE	25	0
	AN : AMIKACINE	26	0
	CS : COLISTINE	17	+2
<u>Boite 2 :</u>	TE : TETRACYCLINE	16	0
	CTX : CEFOTAXIME	31	0
	ATM : AZTREONAM	28	0
	CAZ : CEFTAZIDIME	25	0
	IPM : IMIPENEM	30	0
	AMC : AMOXICILLINE+ACIDE CLAVULANIQUE	17	-1
N.B.: AMC : AMOXICILLINE+ACIDE CLAVULANIQUE = AUGMENTIN.			
<u>Boite 3 :</u>	CF : CEFALOTINE	19	0
	PIP : PIPERACILLINE	26	0
	CTX : CEFOTAXIME	31	0
	FOX : CEFOXITINE	25	0
	TIC : TICARCILLINE	25	0
	AMC : AMOXICILLINE+ACIDE CLAVULANIQUE	17	-1

Dr LEZZAR Nawel

Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

Boite 4 :	C : CHLORAMPHENICOL	25	0
	NA : ACIDE NALIDIXIQUE	23	0
	SXT :TRIMETHOPRIME+SULFAMETHOXAZOLE	23	0
	CIP : CIPROFLOXACINE	32	0
	IPM : IMIPENEM	30	0
N.B.: SXT: TRIMETHOPRIME + SULFAMETHOXAZOLE = BACTRIME.			

N.B.: (0) = Compris dans l'intervalle / (+/-) = écarts de points acceptables (de 1 ou 2 points).

Voir l'antibiogramme de la souche de référence (*E.coli* ATCC 25922).

➤ Lecture comparative de l'Antibiogramme de la souche O78 et la souche de référence (*E.coli* ATCC 25922) à différents antibiotiques:

Tableau 58 : Résultats De L'antibiogramme De La Souche O78 (in vitro) Et De La Souche De Référence (*E.coli* ATCC 25922) A Différents Antibiotiques

<u>GROUPES</u>	<u>ANTIBIOTIQUES TESTES</u>	<u>Diamètre d'inhibition (mm)</u>			
		<u>Et Interprétation</u>			
		O78		Référence	
<u>Groupe 1 :</u>	FOX : CEFOXITINE	25	(S)	25	0
	CAZ : CEFTAZIDIME	29	(S)	25	0
	FEP : CEFEPIME	33	(S)	---	---
	ATM : AZTREONAM	34	(S)	28	0
	AMC : AMOXICILLINE+ACIDE CLAVULANIQUE	18	(S)	18	0
N.B.: AMC : AMOXICILLINE+ACIDE CLAVULANIQUE = AUGMENTIN.					
<u>Groupe 2 :</u>	TM : TOBRAMYCINE	27	(S)	25	0
	NET : NETILMICINE	32	(S)	---	---
	AN : AMIKACINE	27	(S)	26	0
	S : STREPTOMYCINE	23	(S)	19	0
	K : KANAMYCINE	27	(S)	21	0
	GM : GENTAMICINE	30	(S)	26	0
<u>Groupe 3 :</u>	C : CHLORAMPHENICOL	26	(S)	25	0

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

	SXT : TRIMETHOPRIME+SULFAMETHOXAZOLE	26	(S)	23	0
	UB : FLUMEQUINE	31	(S)	---	---
	NOR : NORFLOXACINE	32	(S)	---	---
	PEF : PEFLOXACINE	30	(S)	---	---
	NA : ACIDE NALIDIXIQUE	24	(S)	23	0
	CIP : CIPROFLOXACINE	36	(S)	32	0
N.B.: SXT : TRIMETHOPRIME + SULFAMETHOXAZOLE = BACTRIME.					
Groupe 4 :	CF : CEFALOTINE	22	(S)	19	0
	PIP : PIPERACILLINE	31	(S)	26	0
	CTX : CEFOTAXIME	35	(S)	31	0
	TIC : TICARCILLINE	32	(S)	25	0
	AMX : AMOXICILLINE	22	(S)	---	---
Groupe 5 :	IPM : IMIPENEM	30	(S)	30	0
	MNO : MINOCYCLINE	14	(R)	---	---
	TE : TETRACYCLINE	17	(I)	18	0
	CS : COLISTINE	21	(S)	16	+1

N.B.: (S): SENSIBLE / (I): INTERMEDIAIRE / (R): RESISTANT / (0) = Compris dans l'intervalle / (+/-) = écarts de points acceptables (de 1 ou 2 points) / (---): Disque non utilisé.

➤ Lecture comparative de l'antibiogramme de la souches O78 (in vitro) provenant d'une suspension de 24h et de de la souches O78 (in vitro) provenant d'une suspension de 48h aux quinolones et β -lactamines:

Tableau 59 : Résultats De L'antibiogramme De La Souche O78 (de 24h) Et De La Souche O78 (de 48h) Aux Quinolones Et β -Lactamines

Famille d'ATB	ANTIBIOTIQUES TESTES	O78 de 24h		O78 de 48h	
QUINOLONES	NA : ACIDE NALIDIXIQUE	20	S	20	S
	UB : FLUMEQUINE	28	S	28	S
	NOR : NORFLOXACINE	30	S	30	S
	PEF : PEFLOXACINE	26	S	26	S
	CIP : CIPROFLOXACINE	36	S	36	S

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

β -LACTAMINES	AMC : AMOXICILLINE+ACIDECLAVULANIQUE	10	R	10	R
---------------------	--------------------------------------	----	---	----	---

➤ Lecture de l'antibiogramme de la souche O78 (in vitro) aux quinolones:

Tableau 60 : Résultats De L'antibiogramme De La Souche O78 (in vitro)

Aux Quinolones

Famille d'ATB	ANTIBIOTIQUES TESTES	O78 (in vitro)	
QUINOLONES	CIP : CIPROFLOXACINE	40	S
	PEF : PEFLOXACINE	27	S
	NA : ACIDE NALIDIXIQUE	22	S
	UB : FLUMEQUINE	30	S
	NOR : NORFLOXACINE	--	--
β -LACTAMINES	AMC : AMOXICILLINE+ACIDECLAVULANIQUE	17	I

(--): Disque manquant dans le distributeur de disques.

➤ Lecture comparative de l'antibiogramme de 2 souches d'*E. coli* (pathogène et saprophyte) aux quinolones:

Tableau 61 : Résultats De L'Antibiogramme Des Souches d'*E.coli* :

De Laboratoire (O78) Et De L'élevage (Saprophyte) Aux Quinolones.

Souches d' <i>E. coli</i>	PEF		NOR		UB		NA		CIP	
<i>E. coli</i> O78:K80	29	S	35	S	30	S	24	S	42	S
<i>E. coli</i> saprophyte	19	I	27	S	21	I	6	R	35	S

➤ Lecture des résultats de la 1ère série d'Antibiogrammes aux quinolones (provenant des prélèvements sur des sujets traités et inoculés = FL03+, FL24+, EN03+, EN24+):

Tableau 62 : Résultats De la 1ère série d'Antibiogrammes Aux Quinolones

<i>E. coli</i> , N°:	PEF		NOR		UB		NA		CIP	
19	6	R	8	R	8	R	8	R	16	I
20	27	S	27	S	28	S	12	R	32	S
21	6	R	10	R	6	R	6	R	18	I
28	22	S	17	S	25	S	13	R	22	S
29	6	R								
30	22	S	17	S	26	S	12	R	21	S

31	6	R								
38	26	S	27	S	28	S	20	S	35	S
39	6	R	6	R	6	R	6	R	15	R
40	22	S	18	S	27	S	20	S	24	S
41	6	R	6	R	6	R	6	R	22	S
48	22	S	19	S	28	S	12	R	23	S
49	6	R								
50	27	S	30	S	28	S	23	S	32	S
51	6	R								
58	22	S	26	S	28	S	22	S	28	S
59	6	R	6	R	6	R	6	R	15	R
60	26	S	30	S	31	S	14	I	32	S
68	26	S	32	S	28	S	23	S	32	S
69	6	R								
71	6	R								
79	6	R	6	R	6	R	6	R	15	R
80	26	S	32	S	28	S	13	S	32	S
81	6	R	6	R	6	R	6	R	16	I

(S):souche sensible /(I):souche intermédiaire /(R):souche résistante /(R):souche très résistante.

➤Lecture des résultats de la 2ème série d'Antibiogrammes aux quinolones (provenant des prélèvements sur des sujets traités et non inoculés = FL03-, FL24-, EN03-, EN24-):

Tableau 63 : Résultats De la 2ème série d'Antibiogrammes Aux Quinolones

E. coli, N°:	PEF		NOR		UB		NA		CIP	
26	6	R	6	R	6	R	6	R	16	I
33	26	S	30	S	31	S	14	I	32	S
34	6	R	8	R	6	R	6	R	18	I
35	26	S	32	S	28	S	13	R	32	S
43	22	S	20	S	26	S	14	I	22	S
44	6	R	8	R	6	R	6	R	17	I

Dr LEZZAR Newel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

46	6	R	10	R	6	R	6	R	15	R
53	26	S	30	S	31	S	24	S	32	S
54	6	R	8	R	6	R	6	R	17	I
55	26	S	30	S	30	S	12	R	32	S
56	6	R	6	R	6	R	6	R	16	I
63	26	S	32	S	28	S	13	R	32	S
64	6	R	6	R	6	R	6	R	16	I
65	26	S	32	S	28	S	22	S	32	S
73	26	S	30	S	31	S	14	I	32	S
75	22	S	17	S	25	S	19	S	22	S
76	6	R	8	R	6	R	6	R	18	I
83	27	S	27	S	28	S	22	S	32	S
85	26	S	32	S	28	S	23	S	32	S
86	6	R	6	R	6	R	6	R	16	I

(S):souche sensible /(I):souche intermédiaire /(R):souche résistante /(R):souche très résistante.

(cf. Annexe 22 et 23)

PHOTOS DE L'ETUDE BACTERIOLOGIQUE

1. LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE

1.1 MATERIEL DE LABORATOIRE

1.2 MILIEUX BACTERIOLOGIQUES

1.3 REACTIFS ET COLORANTS

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL

2.1 PREPARATION DE L'INOCULUM

2.2 RECEPTION DES PRELEVEMENTS

2.3 RECHERCHE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES (Coloration De Gram)

2.4 RECHERCHE DES CARACTERES CULTURAUX (Colonies Bactériennes)

2.5 RECHERCHE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES (Galerie Classique)

2.6 RECHERCHE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES (Galerie API 20 E)

2.7 RECHERCHE DES CARACTERES ANTIGENIQUES (Sérotypage)

2.8 RECHERCHE DE L'ANTIBIORESISTANCE (Antibiogramme)

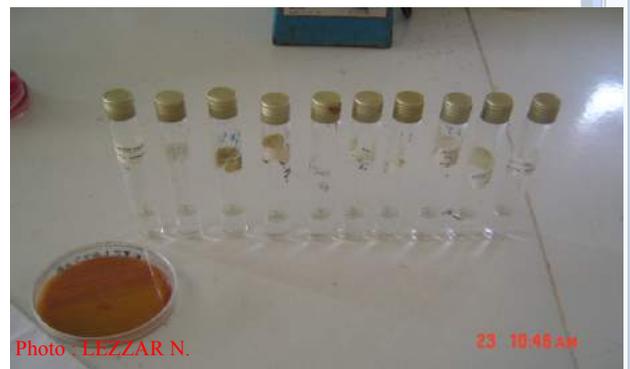


Photo : LEZZAR N.

1. LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE : 1.1 MATERIEL DE LABORATOIRE (1)



1. Lames et lamelles



2. Tubes en verre à capsule métallique (à vis)



3. Boîtes de Pétri



4. Anse de platine et Pipettes Pasteur



5. Ecouillons stériles



6. Micropipettes avec embouts à usage unique



7. Pince anatomique et disques d'antibiotiques



8. Distributeurs de disque à 6 cartouches

1. LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE : 1.1 MATERIEL DE LABORATOIRE (2)



9. Bec bunsen



10. Agitateur ou vortex



Photo : LEZZAR N.

11. Microscope binoculaire à chariot mobile



Photo : LEZZAR N.

12. Spectrophotomètre



Photo : LEZZAR N.

13. Autoclave



Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

14. Etuve à 35°C



Photo : LEZZAR N.

16. Distillateur (à gauche) et réfrigérateur (à droite)



Photo : LEZZAR N.

15. Balances électroniques



Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

1. LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE : 1.2 MILIEUX BACTERIOLOGIQUES (1)



Photo : LEZZAR N.

1. Milieu de Gélose Nutritive



Photo : LEZZAR N.

2. Milieu de Base pour Gélose au Sang



Photo : LEZZAR N.

1 10:31 AM

3. Milieu d'Héktoen



Photo : LEZZAR N.

1 10:59 AM

4. Milieu de Chapman



Photo : LEZZAR N.

1 10:35 AM

5. Milieu de Sélénite



Photo : LEZZAR N.

1 10:33 AM

6. Milieu de Mueller-Hinton



Photo : LEZZAR N.

7 10:04 AM

7. Géloses liquéfiées après passage à l'autoclave



Photo : LEZZAR N.

7 1:50 PM

8. Géloses coulées en boîte de Pétri

1. LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE : 1.2 MILIEUX BACTERIOLOGIQUES (2)



Photo : LEZZAR N.

7 9:20 AM

9. Milieu de Mannitol-Mobilité



Photo : LEZZAR N.

7 9:21 AM

10. Milieu de Citrate de Simmons

Dr LEZZAR Navel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

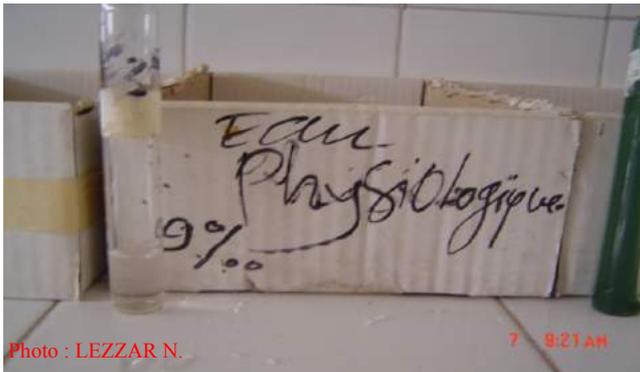


Photo : LEZZAR N.

7 9:21 AM

11. Eau physiologique



Photo : LEZZAR N.

7 9:21 AM

12. Milieu de T.S.I.



Photo : LEZZAR N.

7 9:21 AM

13. Milieu de B.H.I.B.



Photo : LEZZAR N.

7 9:22 AM

14. Milieu de Sélénite



Photo : LEZZAR N.

7 9:22 AM

15. Milieu de Clark & Lubs

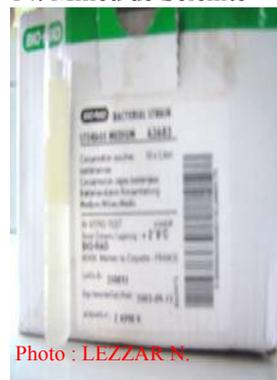


Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

16. Milieu de conservation (BIORAD)

1. LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE : 1.3 REACTIFS ET COLORANTS



Photo : LEZZAR N.

1. Disques de sélénites (et bouillon de sélénite)



Photo : LEZZAR N.

2. Réactif Urée-Indole



Photo : LEZZAR N.

3. Réactif de T.D.A.



Photo : LEZZAR N.

4. Réactif de Voges-Proskauer I et II



Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

5. Réactif de Kovacs (avant et après son addition)



Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

6. Réactif Rouge de Méthyle (avant et après son addition)



Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

7. Huile de vaseline stérile / Huile d'immersion



Photo : LEZZAR N.



Photo : LEZZAR N.

8. Violet de Gentiane / Lugol / Fuchsine

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.1 PREPARATION DE L'INOCULUM



1. La souche pathogène d'*E. coli* (O78:K80)



2. Le milieu P.B.S. (milieu de dilution de l'inoculum)



3. Réalisation d'une série de dilution de l'inoculum (1)



4. Réalisation d'une série de dilution de l'inoculum (2)



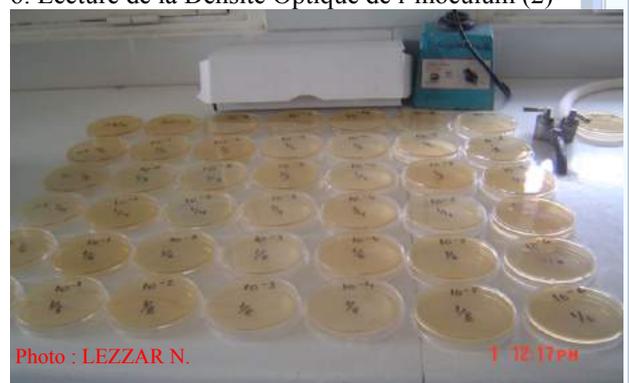
5. Lecture de la Densité Optique de l'inoculum (1)



6. Lecture de la Densité Optique de l'inoculum (2)



7. Dénombrement des colonies bactériennes (1)



8. Dénombrement des colonies bactériennes (2)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.2 RECEPTION DES PRELEVEMENTS

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



Photo : LEZZAR N. 14 2:18 PM

1. Réception des prélèvements



Photo : LEZZAR N. 18 1:01 PM

2. Préparation du milieu d'enrichissement

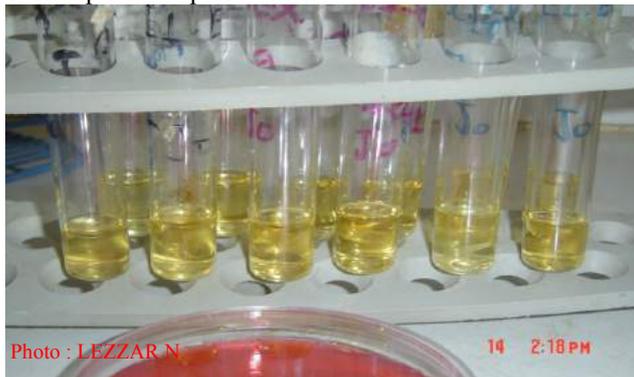


Photo : LEZZAR N. 14 2:18 PM

3. Milieu d'enrichissement (milieu B.H.I.B.)

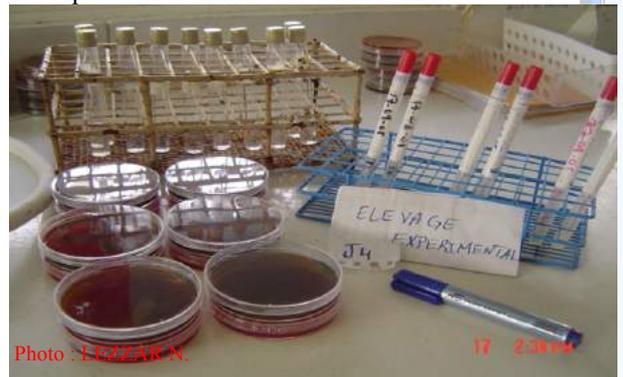


Photo : LEZZAR N. 17 2:38 PM

4. Préparation des milieux d'isolement

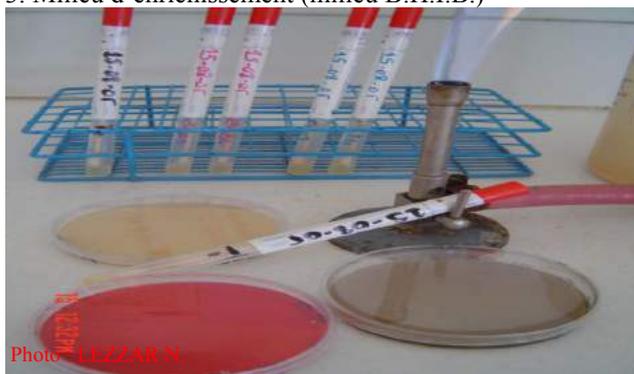


Photo : LEZZAR N. 15 12:29 PM

5. Milieux d'isolement (pour la flore fécale)



Photo : LEZZAR N. 15 12:29 PM

6. Milieux d'isolement (pour *Escherichia coli*)



Photo : LEZZAR N. 18 1:23 PM

7. Prélèvements effectués au cours de l'élevage (1)



Photo : LEZZAR N. 18 1:23 PM

8. Prélèvements effectués au cours de l'élevage (2)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.3 RECHERCHE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES (Coloration De Gram) (1)

Spécialité en Aviculture et Pathologie Aviaire



Photo : LEZZAR N.

11 11:27 AM

1. Prélever une colonie bactérienne (une colonie d'*E. coli*)



Photo : LEZZAR N.

11 11:28 AM

2. Mélanger la colonie (écrasée) à l'eau physiologique



Photo : LEZZAR N.

11 11:30 AM

3. Flamber la lame pour fixer les bactéries



Photo : LEZZAR N.

4. Laisser sécher les lames quelques minutes



Photo : LEZZAR N.

11 11:32 AM

5. Colorer au Violet de Gentiane



Photo : LEZZAR N.

11 11:32 AM

6. Laisser agir une minute



Photo : LEZZAR N.

11 11:33 AM

7. Rincer à l'eau

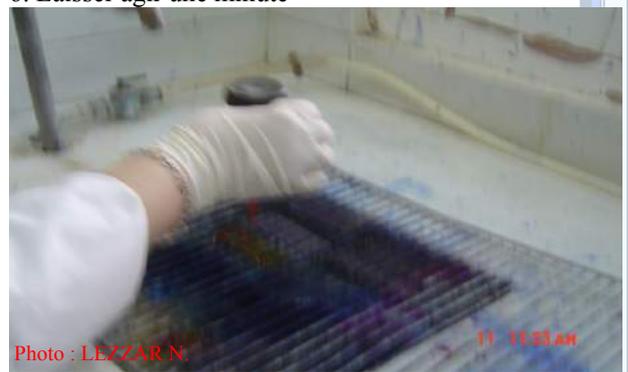


Photo : LEZZAR N.

11 11:33 AM

8. Colorer au Lugol

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.3 RECHERCHE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES (Coloration De Gram) (2)

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



Photo : LEZZAR N.

9. Laisser agir une minute



Photo : LEZZAR N.

10. Rincer à l'eau



Photo : LEZZAR N.

11. Verser de l'alcool

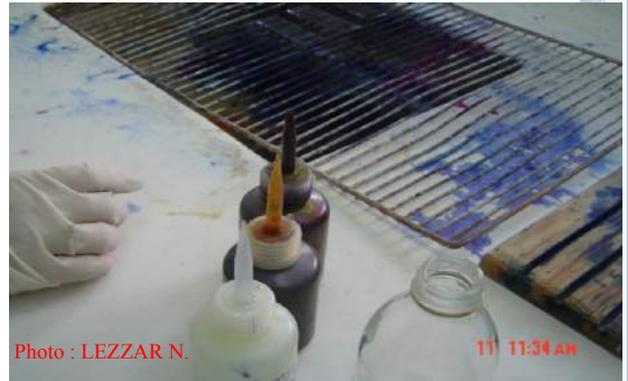


Photo : LEZZAR N.

12. Laisser agir 30 secondes



Photo : LEZZAR N.

13. Rincer à l'eau



Photo : LEZZAR N.

14. Colorer à la Fuchsine



Photo : LEZZAR N.

15. Laisser agir une minute



Photo : LEZZAR N.

16. Rincer à l'eau

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.3 RECHERCHE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES (Coloration De Gram) (3)

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

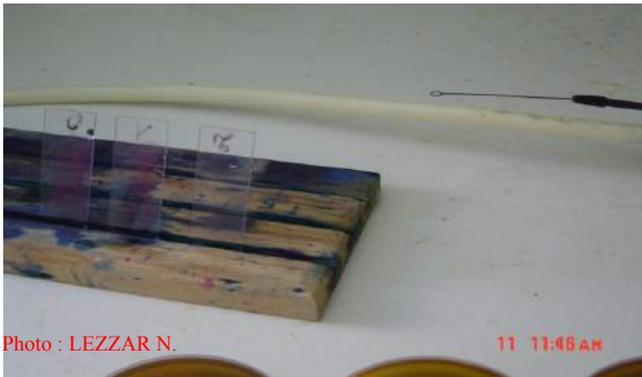


Photo : LEZZAR N. 11 11:48 AM

17. Laisser sécher les lames inclinées quelques minutes



Photo : LEZZAR N. 11 11:58 AM

18. Mettre une goutte d'huile d'immersion



Photo : LEZZAR N. 11 1:19 PM

19. Recouvrir d'une lamelle et lire avec l'objectif 100

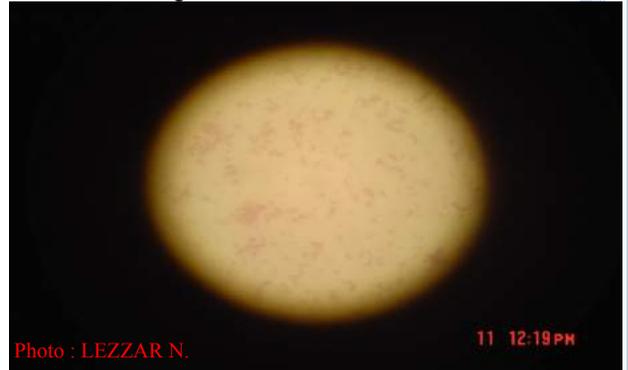


Photo : LEZZAR N. 11 12:19 PM

20. Bacilles roses en amas polymorphes (zoom 1)

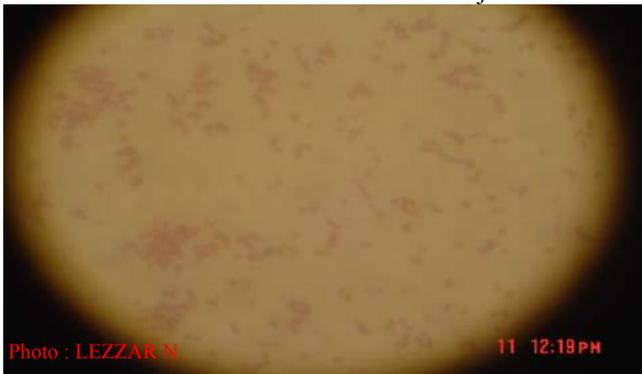


Photo : LEZZAR N. 11 12:19 PM

21. Bacilles roses en amas polymorphes (zoom 2)

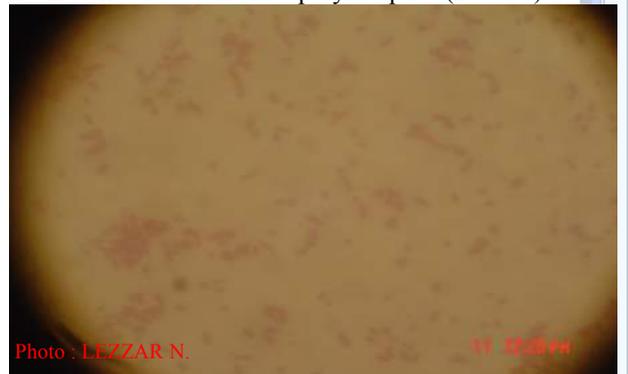


Photo : LEZZAR N. 11 12:20 PM

22. Bacilles roses en amas polymorphes (zoom 3)

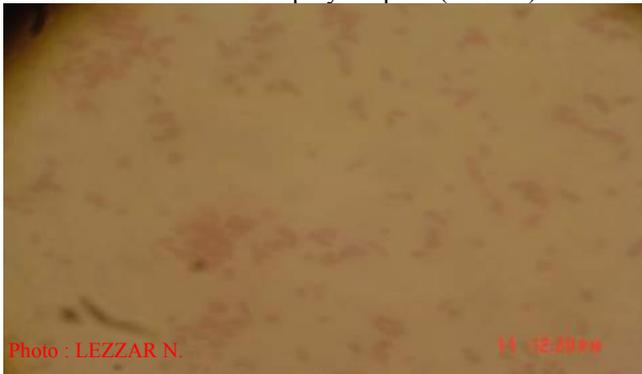


Photo : LEZZAR N. 11 12:20 PM

23. Bacilles roses en amas polymorphes (zoom 4)

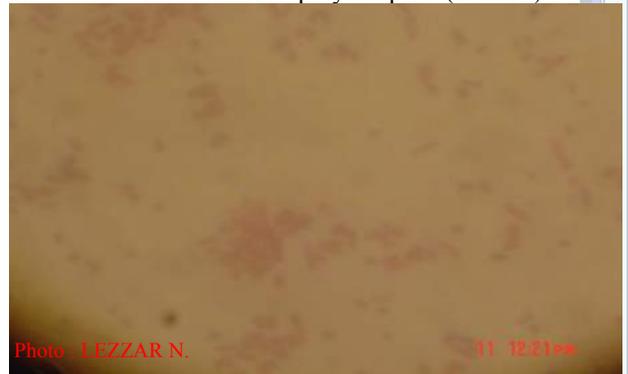


Photo : LEZZAR N. 11 12:21 PM

24. Bacilles roses en amas polymorphes (zoom 5)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.4 RECHERCHE DES CARACTERES CULTURAUX (Colonies Bactériennes) (1)

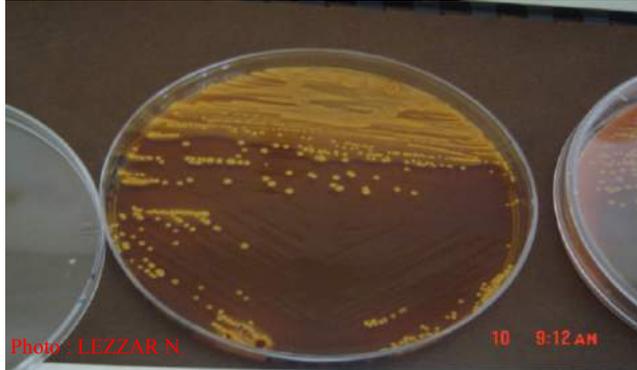
Dr LEZZAR Newel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



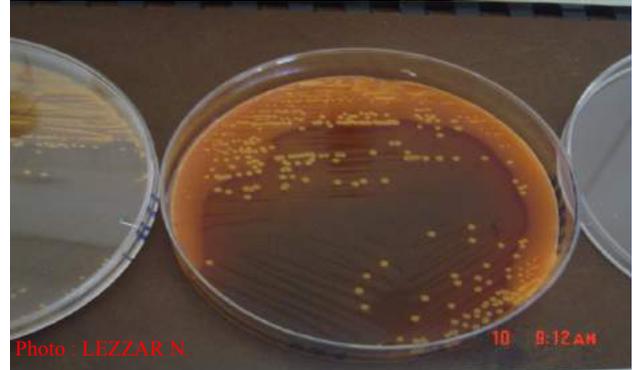
1. *E. coli* ATCC 25922 (souche du laboratoire du C.H.U.)



2. *E. coli* O78:K80 (souche du L.R.V.)



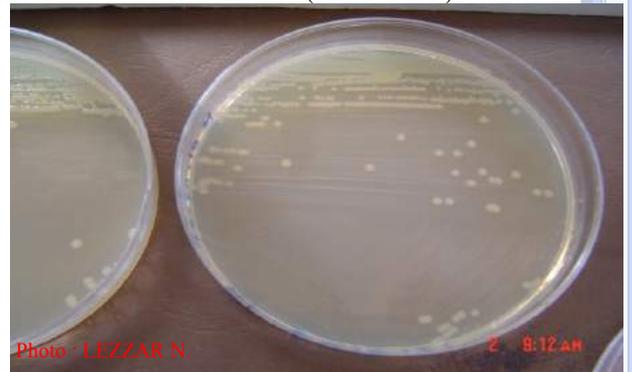
3. *E. coli* ATCC 25922 (sur Héктоen)



4. *E. coli* O78:K80 in vitro (sur Héктоen)



5. *E. coli* ATCC 25922 (sur Gélöse Nutritive)



6. *E. coli* O78:K80 in vitro (sur Gélöse Nutritive)



7. *E. coli* ATCC 25922 (sur Base Gélöse au Sang)

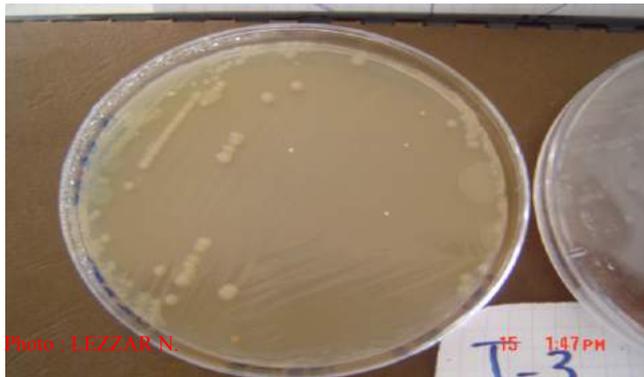


8. *E. coli* O78:K80 in vitro (sur Base Gélöse au Sang)

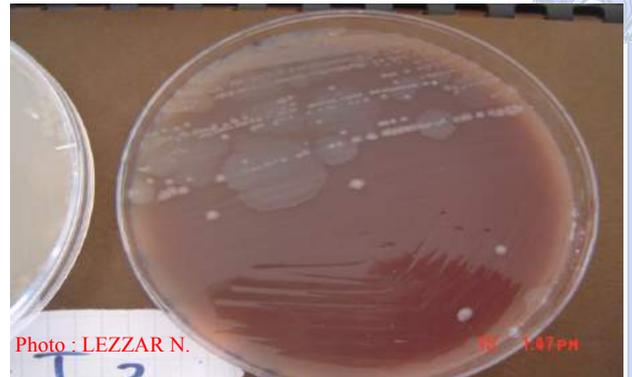
2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.4 RECHERCHE DES CARACTERES CULTURAUX (Colonies Bactériennes) (2)

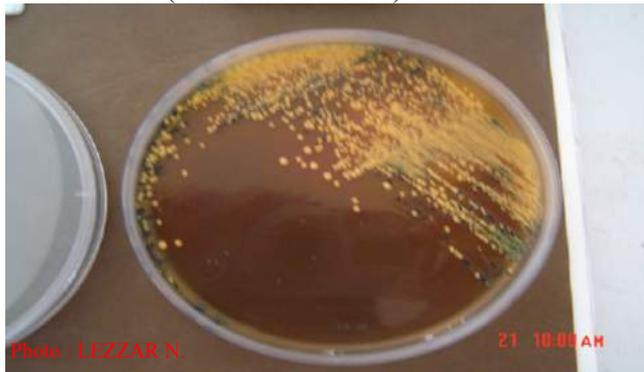
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



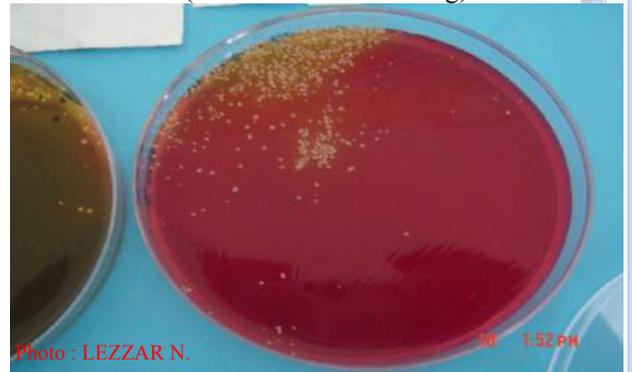
9. Flore fécale (sur Gélose Nutritive)



10. Flore fécale (sur Base Gélose au Sang)



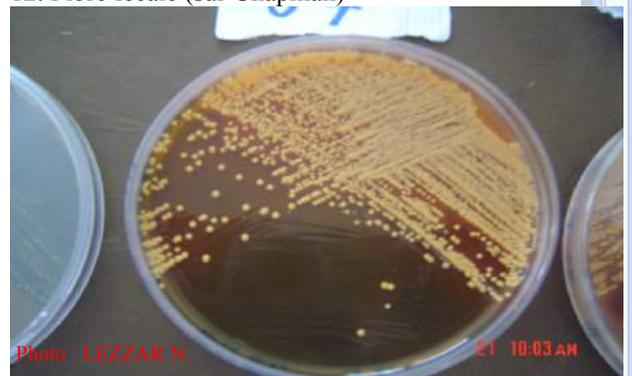
11. Flore fécale (sur Héктоen)



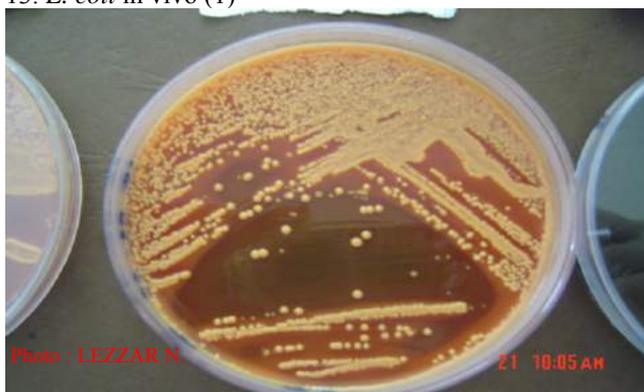
12. Flore fécale (sur Chapman)



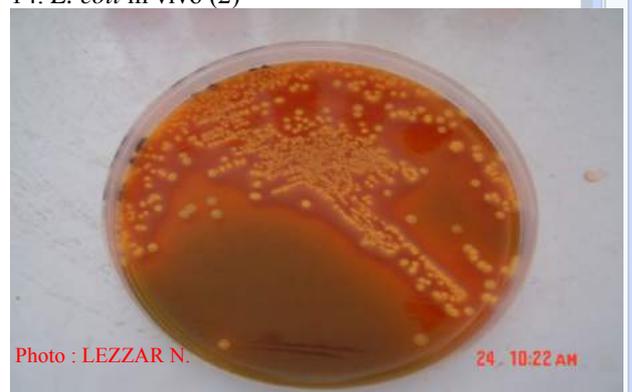
13. *E. coli* in vivo (1)



14. *E. coli* in vivo (2)



15. *E. coli* in vivo (3)



16. *E. coli* in vivo (4)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.4 RECHERCHE DES CARACTERES CULTURAUX (Colonies Bactériennes) (3)

Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



Photo : LEZZAR N.

17. *E. coli* O78:K80 in vivo (1)



Photo : LEZZAR N.

18. *E. coli* O78:K80 in vivo (2)

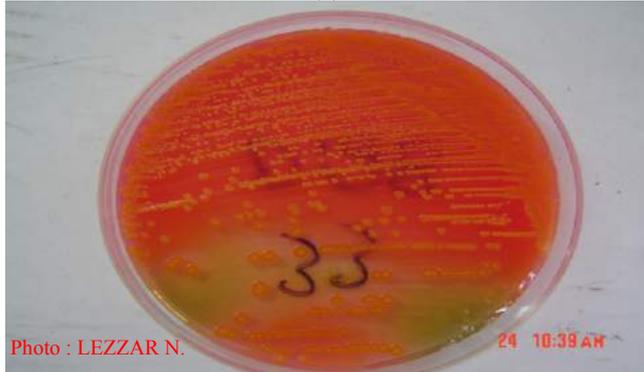


Photo : LEZZAR N.

19. *E. coli* O78:K80 in vivo (3)



Photo : LEZZAR N.

20. *E. coli* O78:K80 in vivo (4)

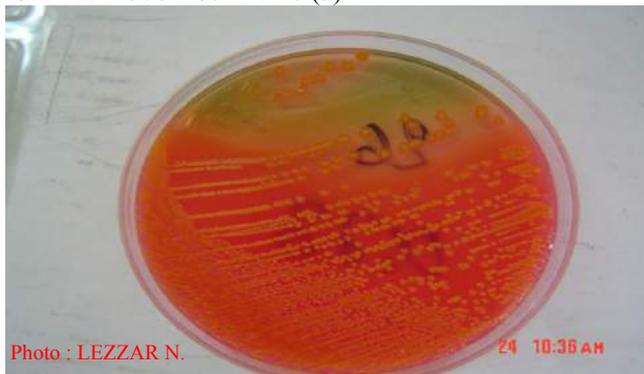


Photo : LEZZAR N.

21. *E. coli* O78:K80 in vivo (5)

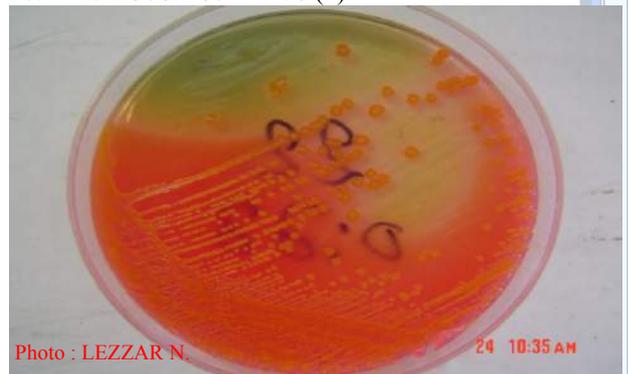


Photo : LEZZAR N.

22. *E. coli* O78:K80 in vivo (6)

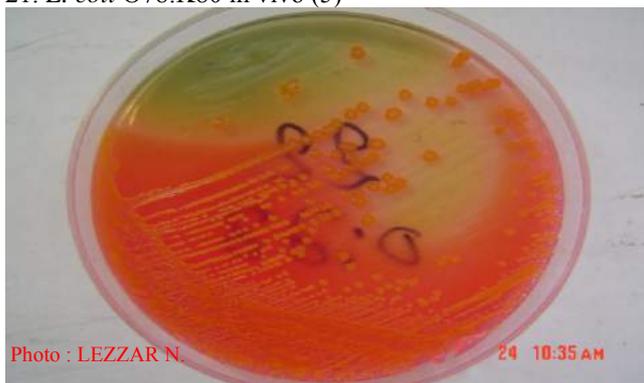


Photo : LEZZAR N.

23. *E. coli* O78:K80 in vivo (7)



Photo : LEZZAR N.

24. *E. coli* O78:K80 in vivo (8)

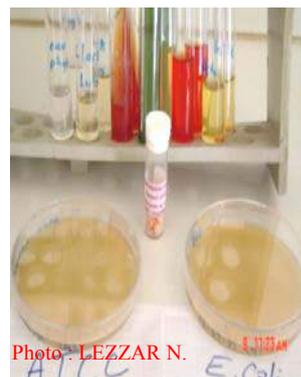
2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.5 RECHERCHE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES (Galerie Classique) (1)

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



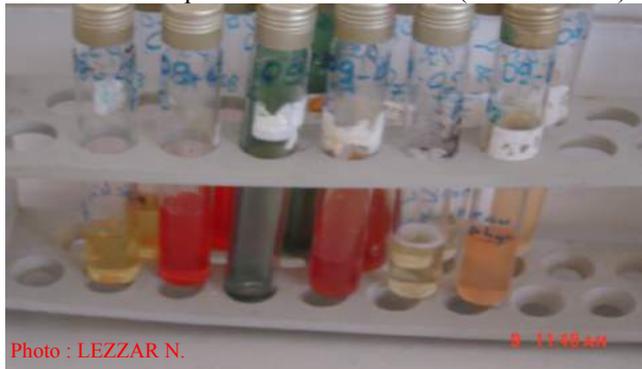
1. Galerie classique de 2 souches de labo. (ATCC et O78)



2. Addition du disque de sélénite et de l'urée-indole



Photo : LEZZAR N.



3. Galerie classique des 2 souches avant incubation



4. Galerie classique des 2 souches 24h après incubation



5. Milieu Urée-Indole avant et après addition du réactif Kovacs



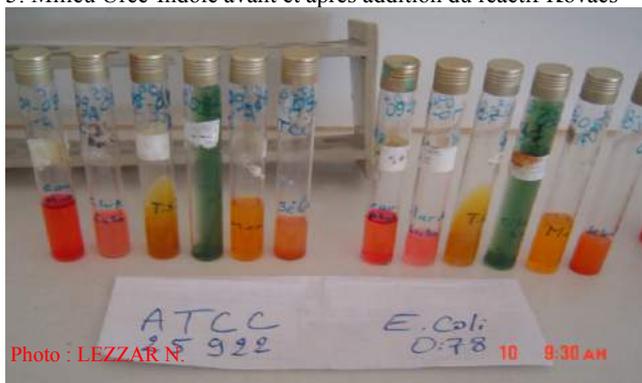
Photo : LEZZAR N.



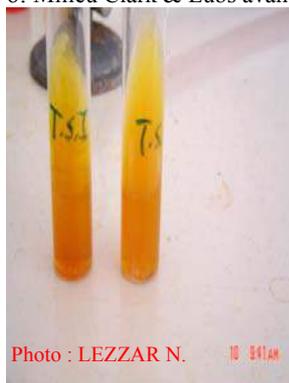
6. Milieu Clark & Lubs avant et après addition du R.M.



Photo : LEZZAR N.



7. Galerie classique des 2 souches après addition des réactifs



8. Milieu de TSI à gauche et de Mannitol-Mobilité à droite



Photo : LEZZAR N.

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.5 RECHERCHE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES (Galerie Classique) (2)

Dr LEZZAR Nawel
Specialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



Photo : LEZZAR N.

9. Galerie classique d'*E.coli* avant addition des réactifs



Photo : LEZZAR N.

10. Galerie classique d'*E.coli* après addition des réactifs



Photo : LEZZAR N.

11. Galerie classique d'une *Klebsielle*



Photo : LEZZAR N.

12. Galerie classique d'*E.coli* (1)



Photo : LEZZAR N.

13. Galerie classique d'un *Bacille Non-Fermenter*



Photo : LEZZAR N.

14. Galerie classique d'*E.coli* (2)



Photo : LEZZAR N.

15. Galerie classique d'un *Proteus*

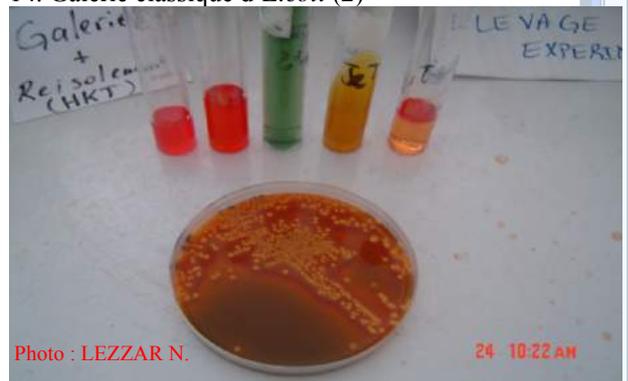


Photo : LEZZAR N.

16. Galerie classique d'*E.coli* (3)

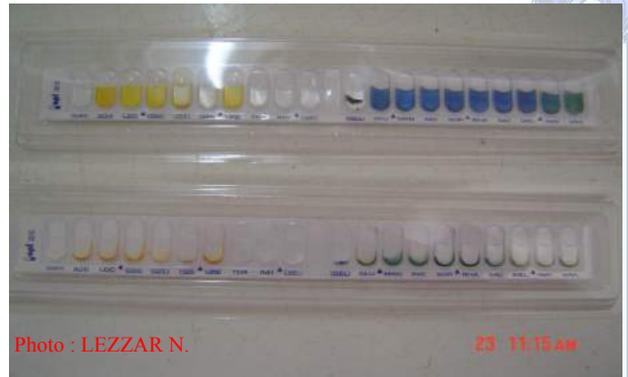
2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.6 RECHERCHE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES (Galerie API 20 E) (1)

Dr LEZZAR Naveel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire



1. Galerie API 20 E et sa fiche de résultat



2. Galerie API 20 E avant incubation



3. Galerie API 20 E après incubation



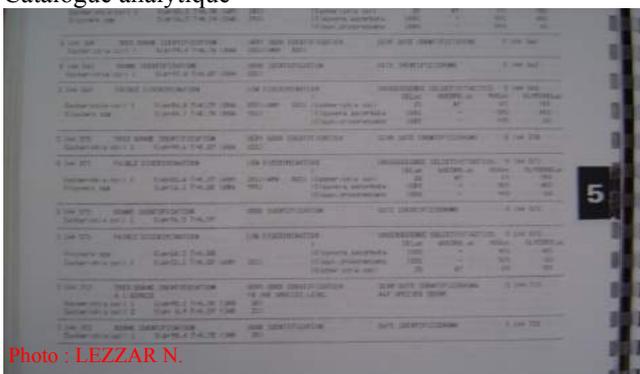
4. Galerie API 20 E après addition des réactifs



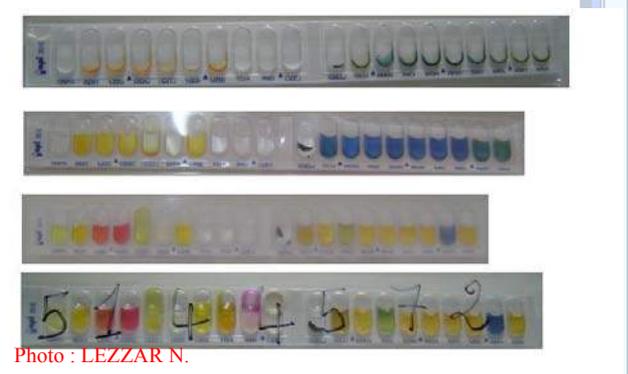
5. Galerie API 20 E et tableau de pourcentages du Catalogue analytique



6. Galerie API 20 E et son profil numérique



7. Galerie API 20 E et tableau d'identification du Catalogue analytique



8. Galerie API 20 E = *Escherichia coli* 1

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.6 RECHERCHE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES (Galerie API 20 E) (2)



Photo : LEZZAR N.

9. Galerie API 20 E d'*E.coli* O78:K80 in vitro avant addition des réactifs



Photo : LEZZAR N.

10. Galerie API 20 E d'*E.coli* O78:K80 in vitro avant et après addition des réactifs



Photo : LEZZAR N.

11. Réalisation de la Galerie API 20 E d'*E.coli* in vivo



Photo : LEZZAR N.

12. Déposer la suspension bactérienne d'*E.coli* in vivo dans les 20 cupules de la galerie (1)



Photo : LEZZAR N.

13. Déposer la suspension bactérienne d'*E.coli* in vivo dans les 20 cupules de la galerie (2)



Photo : LEZZAR N.

14. Déposer la suspension bactérienne d'*E.coli* in vivo dans les 20 cupules de la galerie (3)



Photo : LEZZAR N.

15. Ajouter de l'huile de vaseline stérile dans certaines cupules



Photo : LEZZAR N.

16. Recouvrir la galerie avant de la mettre dans l'étuve à 35°C

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

2.6 RECHERCHE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES (Galerie API 20 E) (3)



Photo : LEZZAR N.

24 12:23 PM

17. Déposer les galerie d'*E.coli* in vivo dans l'étuve



Photo : LEZZAR N.

24 12:29 PM

18. Laisser dans l'étuve pendant 24 heures



Photo : LEZZAR N.

24 09:50 AM

19. Les galerie d'*E.coli* in vivo après incubation



Photo : LEZZAR N.

24 10:30 AM

20. Addition du réactif Voges-Proskauer II (1)

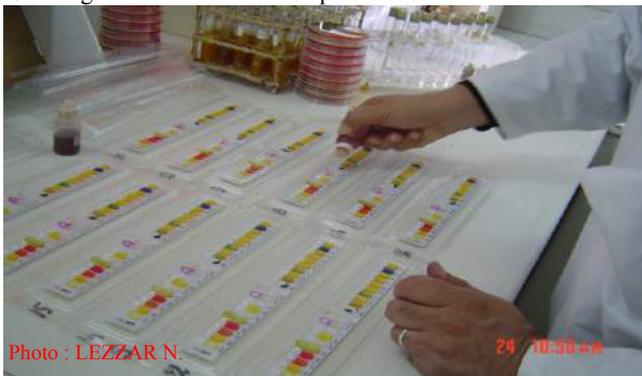


Photo : LEZZAR N.

24 10:50 AM

21. Addition du réactif Voges-Proskauer II (2)



Photo : LEZZAR N.

24 10:50 AM

22. Les galerie d'*E.coli* in vivo après addition des réactifs (1)

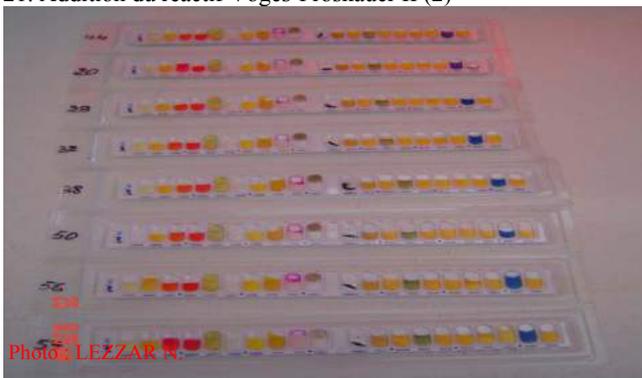


Photo : LEZZAR N.

23. Les galerie d'*E.coli* in vivo après addition des réactifs (2)



Photo : LEZZAR N.

24 10:56 AM

24. Le Profil Numérique d'*E.coli* in vivo = *Escherichia coli* 1

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

2.7 RECHERCHE DES CARACTERES ANTIGENIQUES (Sérotypage) (1)



Photo : LEZZAR N.

16:11:11 AM

1. Réalisation du sérotypage :



Photo : LEZZAR N.

16:12:13 AM

2. Test d'auto-agglutination (O78 et eau physiologique)

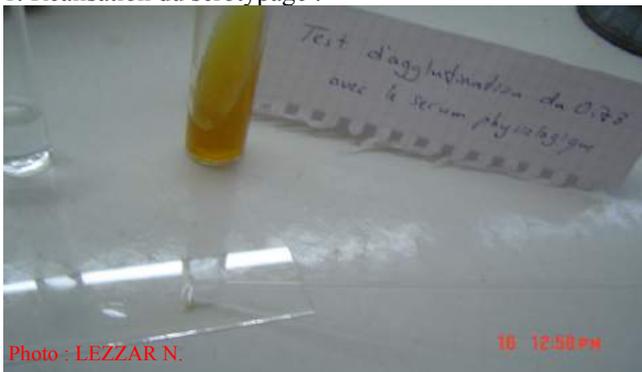


Photo : LEZZAR N.

16:12:50 PM

3. Déposer à côté d'une goutte d'eau physiologique un peu du prélèvement de O78 (à partir du T.S.I.)



Photo : LEZZAR N.

16:12:15 PM

4. Etaler le mélange sur la lame



Photo : LEZZAR N.

16:13:41 AM

5. Test négatif par absence d'auto-agglutination



Photo : LEZZAR N.

16:13:20 AM

6. Test d'agglutination sur lame (*E. coli* O78:K80)



Photo : LEZZAR N.

16:11:30 AM



Photo : LEZZAR N.

16:11:30 AM

7. Test d'agglutination sur lame (sérum spécifique à O78)



Photo : LEZZAR N.

16:11:42 AM

8. Déposer une goutte du sérum spécifique à O78 (1)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

2.7 RECHERCHE DES CARACTERES ANTIGENIQUES (Sérotypage) (2)



9. Déposer une goutte du sérum spécifique à O78 (2)



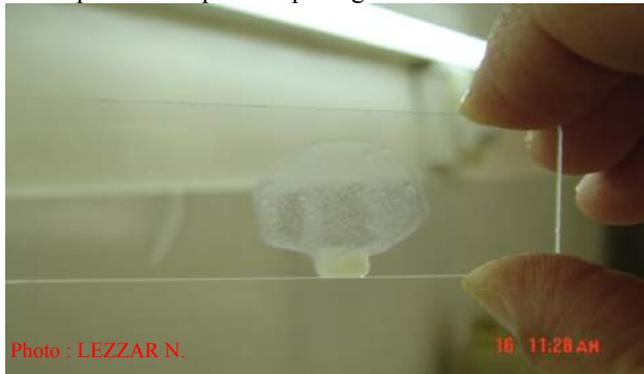
10. Prélever un peu de suspension pathogène (O78)



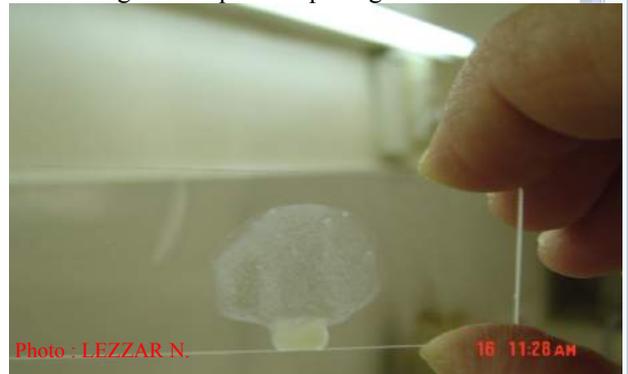
11. Déposer la suspension pathogène à côté du sérum



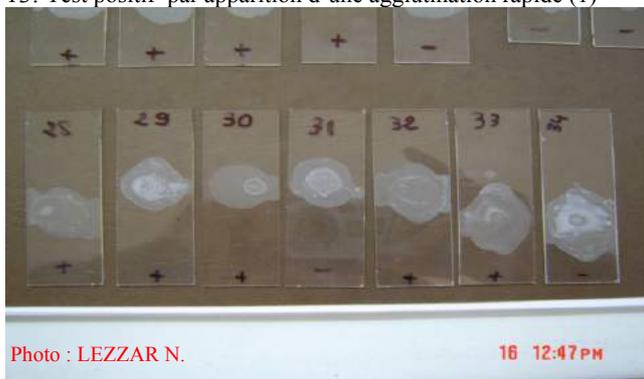
12. Mélanger la suspension pathogène au sérum



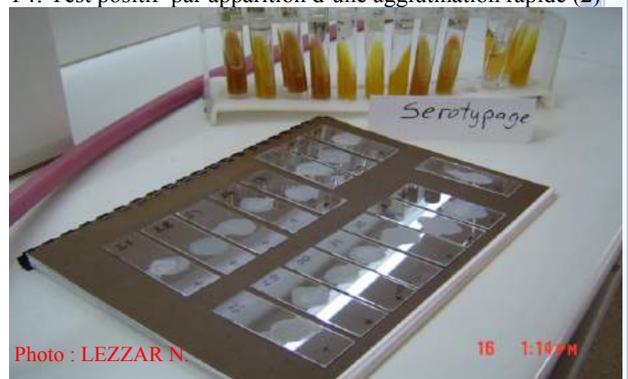
13. Test positif par apparition d'une agglutination rapide (1)



14. Test positif par apparition d'une agglutination rapide (2)



15. Résultats du test sérologique (1)



16. Résultats du test sérologique (2)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.8 RECHERCHE DE L'ANTIBIORESISTANCE (Antibiogramme) (1)



Photo : LEZZAR N.

1. Charger le distributeur de disques de cartouches



Photo : LEZZAR N.

2. Distributeur de disque prêt à l'emploi



Photo : LEZZAR N.

3. Préparer deux suspensions bactérienne (ATCC et O78)



Photo : LEZZAR N.

4. Ensemencer la suspension sur Mueller-Hinton



Photo : LEZZAR N.

5. Appliquer les disques d'antibiotiques sur Mueller-Hinton

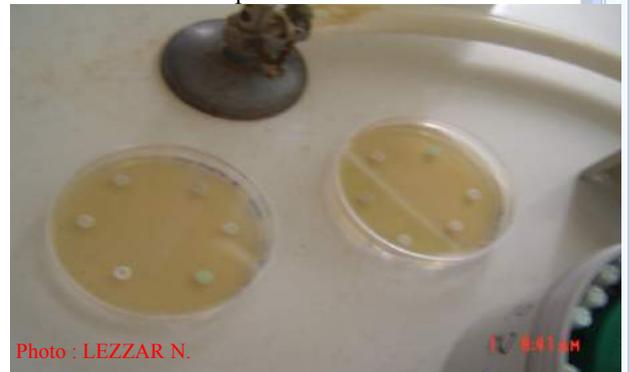


Photo : LEZZAR N.

6. Recouvrir les boîtes de pétri



Photo : LEZZAR N.

7. Mettre à l'étuve pendant 24 heures (1)



Photo : LEZZAR N.

8. Mettre à l'étuve pendant 24 heures (2)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.8 RECHERCHE DE L'ANTIBIORESISTANCE (Antibiogramme) (2)

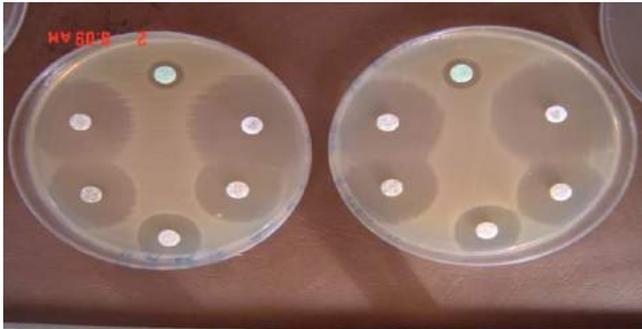


Photo : LEZZAR N.

9. Boîtes de Mueller-Hinton après 24 h d'incubation



Photo : LEZZAR N.

10. Lecture des diamètres des zones d'inhibition

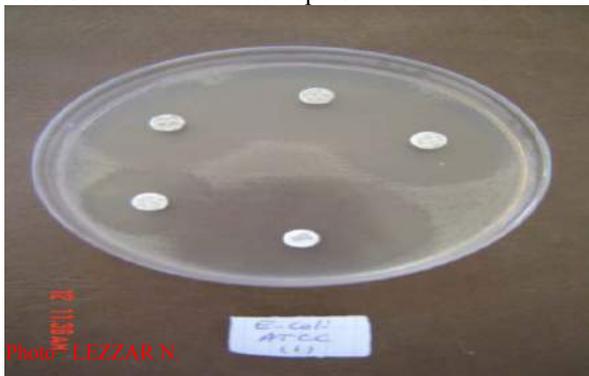


Photo : LEZZAR N.

11. Antibiogramme de la souche de référence 25922 (1)

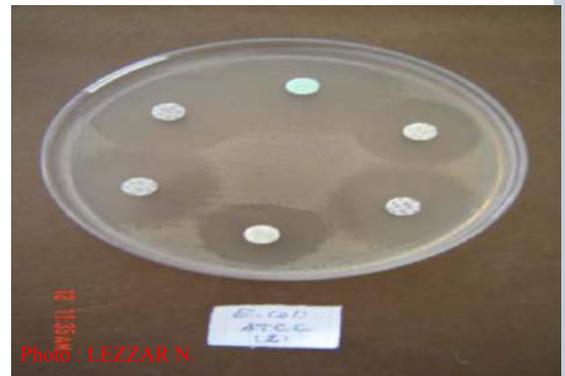


Photo : LEZZAR N.

12. . Antibiogramme de la souche de référence 25922 (2)

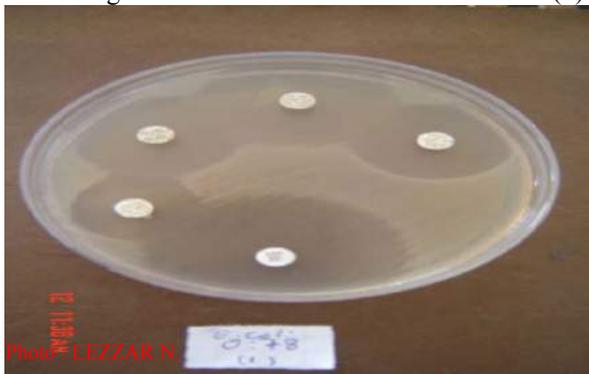


Photo : LEZZAR N.

13. Antibiogramme de la souche pathogène O78 (1)

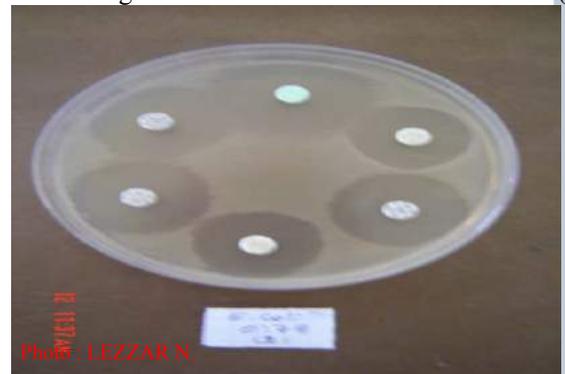


Photo : LEZZAR N.

14. Antibiogramme de la souche pathogène O78 (2)



Photo : LEZZAR N.

15. Antibiogramme de la souche *E. coli* (1)



Photo : LEZZAR N.

16. Antibiogramme de la souche *E. coli* (2)

2. LES ETAPES DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

2.8 RECHERCHE DE L'ANTIBIORESISTANCE (Antibiogramme) (3)



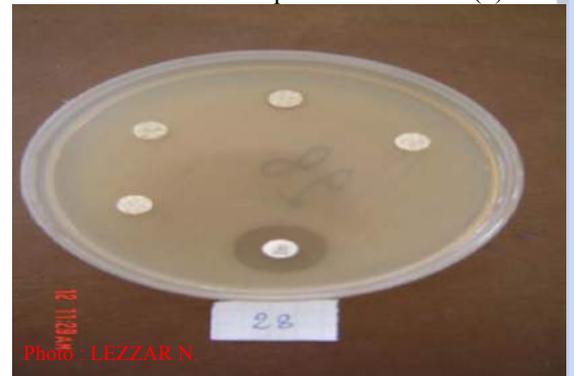
17. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (1)



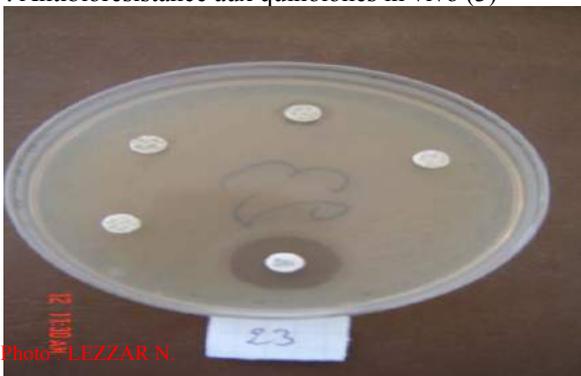
18. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (2)



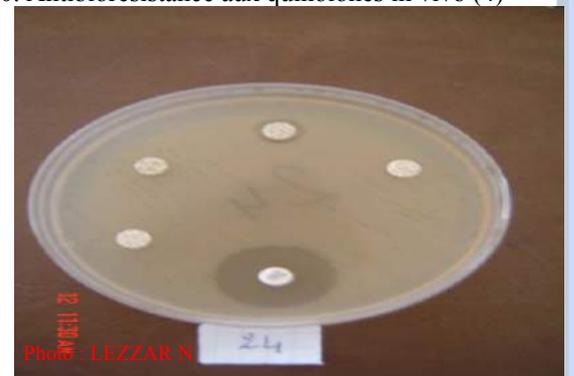
19. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (3)



20. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (4)



21. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (5)



22. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (6)



23. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (7)



24. Antibiorésistance aux quinolones in vivo (8)

RESULTATS

Tous les résultats obtenus, en provenance de l'élevage expérimental ou du laboratoire de bactériologie, sont rassemblés sous forme de données (cf. Annexes) et sont enregistrés sur le logiciel de Microsoft Office Excel 2003 qui nous a permis d'obtenir les figures ci-dessous.

AU NIVEAU DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL

1. L'ELEVAGE EXPERIMENTAL

Il fut mis en place et se déroula de la manière suivante :

- Vide sanitaire: le Samedi 02 juillet 2005.
- Arrivée des poussins: le Mercredi 20 juillet 2005.
- Nombre de poussins à leur arrivée= 101 sujets.
- Début du protocole expérimental:
 - Essai expérimental: Mardi 09 août 2005 (J-4).
 - Inoculation: Samedi 13 août 2005 (J0).
- Fin du protocole expérimental (prélèvements): Dimanche 21 août 2005 (J8).
- Fin de l'élevage expérimental (respecter les délais d'attente): Vendredi 26 août 2005 (J13).

Un suivi journalier de l'élevage expérimental nous a permis d'apprécier les éléments suivants : la consommation d'eau et d'aliment, la quantité des différents produits administrés et la mortalité.

Les quantités d'eau et d'aliment sont relevées tous les jours pendant toute la période de l'élevage expérimentale. (cf. *Annexe I*)

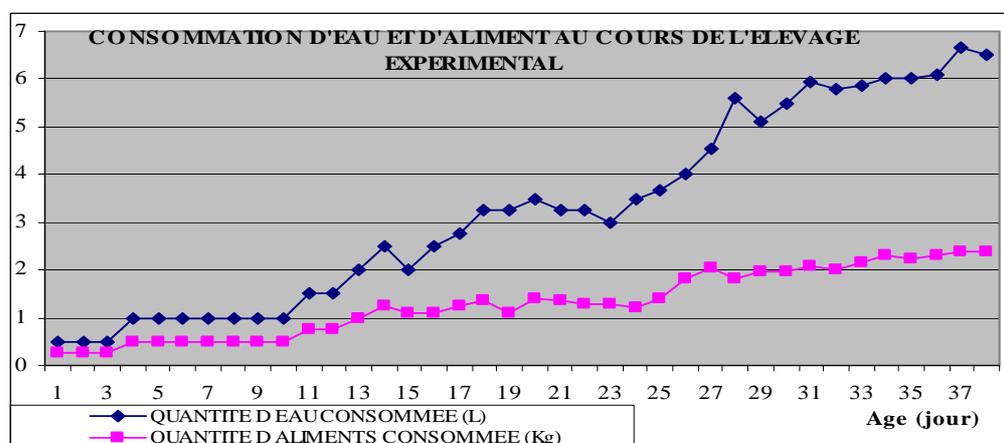


Figure 22 : Consommation d'eau et d'aliment au cours de l'élevage expérimental.

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

On note une progression lente de la consommation d'eau (en bleu) et d'aliments (en rose) ; les deux courbes donnent l'impression de se suivre et montrent une consommation moyenne aussi bien de l'eau que de l'aliment.

Les produits administrés au cours de l'élevage expérimental comprennent des éléments énergétiques (sucre administré sur 4 heures d'abreuvement dès l'arrivée des oiseaux), des sels minéraux (Effydral administré en 1/2 comprimé dans l'eau de boisson pendant les deux premiers jours) et des compléments minéralo-vitaminés (Vital-C dans l'eau de boisson et Bellavet-G dans l'aliment). Un protocole de vaccination fut introduit contre la maladie de New Castle (Pestos) et la maladie de Gumboro (Gumboral) mais n'a pu être réalisé. Les produits thérapeutiques de l'étude furent administrés pendant 3 jours pour l'enrofloxacin et 5 jours pour la fluméquine. Le protocole thérapeutique débute donc à J2 et se termine à J6. (cf. *Annexe 2*)

La mortalité est enregistrée tous les jours pendant toute la période de l'élevage expérimental et à des moments bien précis de ce dernier (Installation du cheptel, Changement de l'aliment, inoculation et traitement) permettant un suivi régulier de l'élevage et apportant une explication claire sur la cause des mortalités recensées. (cf. *Annexe 3*)

Certains éléments, tels que : l'eau, l'aliment et le poids, sont également contrôlés et permettent d'apprécier les conditions d'élevage, la croissance et l'indice de consommation ; et d'établir la dose thérapeutique pour le traitement de la colibacillose expérimentale.(cf. *Annexe 4*)

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le protocole expérimental se déroule selon des étapes et tient compte des paramètres suivants : la date (âge et périodes correspondantes), les périodes du protocole (essai expérimental, séparation des sujets en lots expérimentaux, inoculation et traitement), la répartition des sujets (sujets de l'essai, sujets inoculés, sujets non inoculés, sujets traités, sujets non traités), les éléments que l'on doit contrôler (eau et aliment consommés, poids et mortalité relevés par jour et par lot) et l'effectif de départ. Selon la répartition des sujets, les éléments contrôlés sont rapportés dans le détail pour chaque lot expérimental, nous permettant ainsi d'éviter l'échec thérapeutique. De plus, tous ces paramètres vont faciliter le suivi du protocole expérimental. (cf. *Annexe 5*)

Au cours du protocole expérimental, des prélèvements journaliers sont réalisés de J-4 à J8 et nous permettent de définir avec exactitude la date des prélèvements, l'âge des animaux, les différentes périodes expérimentales (avant, pendant et après le traitement) ainsi que la souche animale concernée. Tous ces éléments recueillis vont nous permettre une interprétation aisée des résultats obtenus par le laboratoire de bactériologie. (cf. *Annexe 6*)

3. PROTOCOLE THERAPEUTIQUE

L'antibiotique est administré selon une posologie thérapeutique bien définie, et la dose administrée (X pour la fluméquine et Y pour l'enrofloxacin) est ajustée selon le mode d'abreuvement (sur 3 heures ou 24 heures) et la quantité d'eau (Z) calculée pour chaque lot expérimental (inoculé et non inoculé). (cf. *Annexe 7*)

La dose de l'antibiotique est calculée en mg et/ou ml (selon l'antibiotique) pour chaque lot traité (inoculé et non inoculé) et dépend du poids des sujets de chaque lot. (cf. *Annexe 8*)

4. PROTOCOLE CLINIQUE

Il se base sur les symptômes et lésions observés ainsi que la mortalité enregistrée :

4.1 Symptômes et lésions

Selon le score établi en début de cette étude, nous avons récoltés les résultats suivants :

4.1.1 Score Symptomatique

Les symptômes observés sont recueillis et classés selon le degré de leur évolution avec une notation (un score) allant de 0 à 5, et la souche animale concernée. On note un état de prostration avec présence ou non de troubles de locomotion qui affecte les deux souches animales. Les symptômes évoluent sous forme de troubles nerveux représentés par un port anormal de la tête et des convulsions que l'on observe que chez la souche Isa 15. (cf. *Annexe 9*)

4.1.2 Score Lésionnel

Les lésions observées sont recueillies et classées selon le degré de leur évolution sur les différents organes, avec une notation (un score) allant de 0 à 6 et la souche animale concernée. Les lésions débutent par une légère congestion des viscères abdominaux. Elles concernent, dans un premier temps, le foie et la rate et affectent les deux souches animales. Elles évoluent ensuite, chez la Isa 15 seulement, par la présence d'un dépôt fibrineux sur le foie et gagnent également les reins par la formation d'un dépôt d'urates. (cf. *Annexe 10*)

4.2 Mortalité

La mortalité est enregistrée quotidiennement dans les différents lots et ce pendant toute la période du protocole expérimental et révèle une mortalité de 20 sujets sur un effectif de 66 sujets. Elle est importantes chez les sujets inoculés et non traités (7 sujets morts sur 10) et chez les sujets inoculés et traités sur 24 h d'abreuvement où l'on note une mortalité de 5 sujets sur 10 pour ceux traités à la fluméquine et de 3 sujets sur 10 pour ceux traités à l'enrofloxacin. Par ailleurs, on a constaté une mortalité élevée 24 heures après inoculation de l'agent pathogène (O78:K80) qui va en diminuant après introduction du protocole thérapeutique. (cf. *Annexe 11*)

La mortalité est également enregistrée quotidiennement dans les différents lots pendant toute la période du protocole expérimental selon la souche animale et le score lésionnel. Cette approche nous renseigne sur l'évolution de la pathologie expérimentale et la résistance de la souche animale face à l'agent pathogène et aux lésions dont il est responsable. Ainsi, la Isa 15 fut la souche animale la plus affectée avec des lésions atteignant un score de 6 comparée à la souche Inconnue qui n'a atteint qu'un score de 3. C'est pour cette raison que nous avons tenu à répartir les souches animales de façon équilibrée dans chaque lot expérimental pour mieux apprécier les paramètres suivants : symptômes, lésions et mortalité pour chacune d'entre elles. (cf. *Annexe 12*)

4.3 Autopsie

Pour chaque sujet mort au cours du protocole expérimental, une fiche d'autopsie est établie et nous renseigne sur la date de la mort, le lot expérimental d'où provient le sujet autopsié, la souche animale à laquelle il appartient et le score lésionnel enregistré (sans oublier le ou les clichés pris lors de son autopsie). Nous aboutissons toujours aux mêmes résultats, à savoir : un score lésionnel de 5 et 6 touchant que la Isa 15, une mortalité élevée pour cette même souche, provenant des lots inoculés et traités sur 24 heures d'abreuvement quelque soit la quinolone utilisée, et apparaissant 24h après inoculation de l'agent pathogène. (cf. *Annexe 13*)

Les clichés pris montrent les lésions observées lors des autopsies effectuées sur des sujets atteints de colibacillose aviaire expérimentale. On constate une prédominance des lésions hépatiques et rénales. Quant au tractus digestif et respiratoire, ils ne révèlent aucune lésion en dehors de quelques congestions signe d'un léger processus inflammatoire. (cf. *Annexe 14*)

Pour chaque sujet sacrifié à J13 du protocole expérimental (qui correspond au 38^{ème} jour de l'élevage expérimental), une fiche d'autopsie est établie et nous renseigne sur le lot expérimental d'où provient le sujet autopsié, la souche animale à laquelle il appartient et le score lésionnel enregistré. Dans le cas présent, on ne peut parler de prédominance d'une souche animale par rapport à l'autre puisque nous avons veillé à ce que les sujets concernés par l'autopsie et provenant de chaque lot expérimental inoculé, soient pris à raison d'un sujet par souche animale par lot ; sauf pour les sujets servant de témoins positifs (inoculés et non traités) où nous avons sacrifiés tous les sujets restants. L'autopsie est pratiquée dans le seul but d'observer l'évolution des lésions (s'il y en a) après arrêt du traitement ; Les scores lésionnels les plus élevés sont enregistrés pour les sujets du lot témoin positif et pour les sujets provenant des lots traités sur 24 heures d'abreuvement et concernant la Isa 15. (cf. *Annexe 15*)

Selon les mortalités enregistrées pendant l'élevage expérimental, ainsi que les symptômes et lésions observés au cours des différentes périodes du protocole expérimental, on a pu définir la souche animale ainsi que les lots expérimentaux les plus concernés, comme le montre les figures qui suivent :

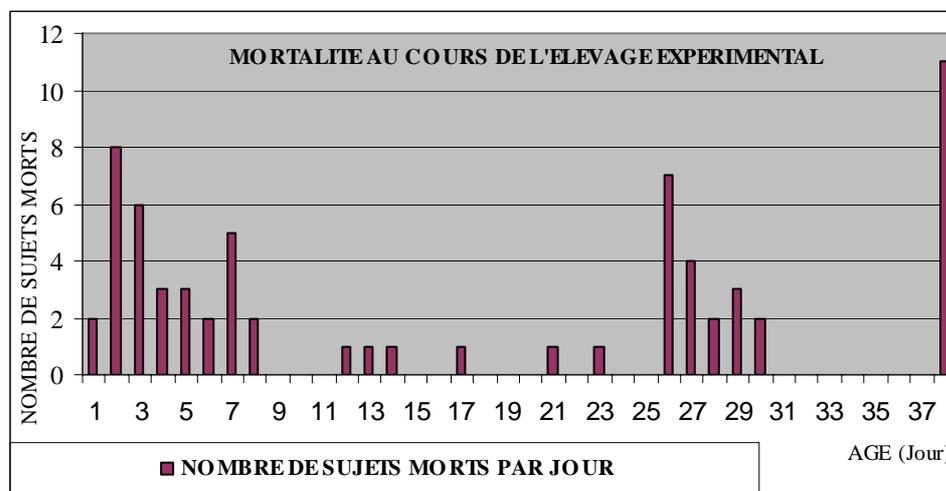


Figure 23 : Mortalité au cours de l'élevage expérimental

Au cours de l'élevage expérimental, un nombre important de sujets morts est enregistré pendant les 3 périodes suivantes : avant le protocole expérimental (de 1 à 8 jours), pendant le protocole expérimental (de 26 à 30 jours) et après le protocole expérimental (à 38 jours) où l'on a sacrifié les sujets inoculés qui ont survécu. On note trois pics de mortalité : un premier 24 heures après installation des poussins dans le bâtiment d'élevage, un second 24 heures après inoculation de l'agent pathogène et un troisième, au 38^{ème} jours (qui correspond à J13).

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

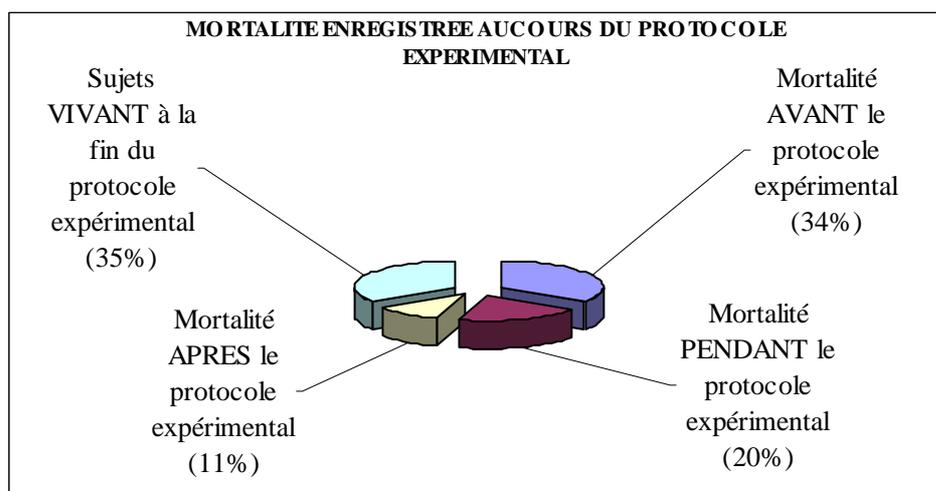


Figure 24 : Mortalité enregistrée au cours du protocole expérimental (%)

On note, au cours de l'élevage expérimental, un taux de mortalité qui varie selon les périodes suivantes : 34% avant le protocole expérimental, 20% pendant le protocole expérimental et 11% (sujets sacrifiés) après le protocole expérimental avec 35% de survivants à la fin du protocole expérimental.

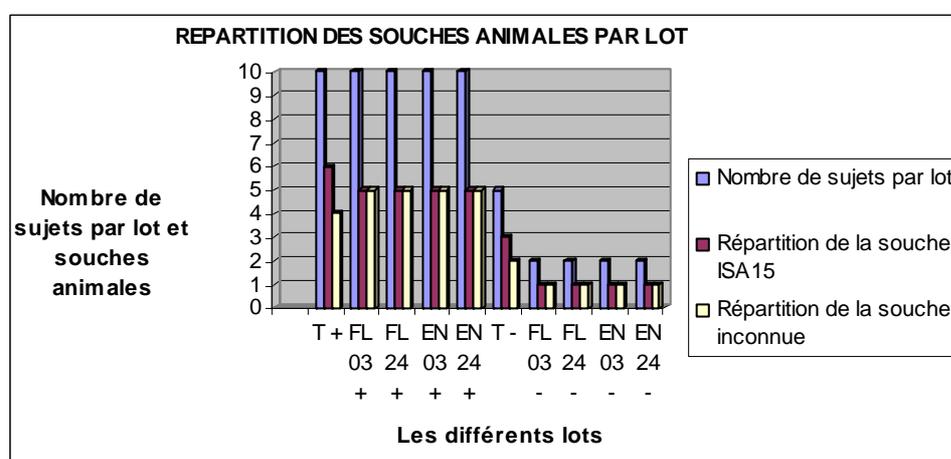


Figure 25 : Répartition des souches animales par lots

La répartition des deux souches animales (Isa 15 et Inconnue) dans les différents lots expérimentaux est faite de façon équilibrée entre les lots inoculés et non inoculés pour bien apprécier l'impacte de l'agent pathogène (O78) sur ces dernières.

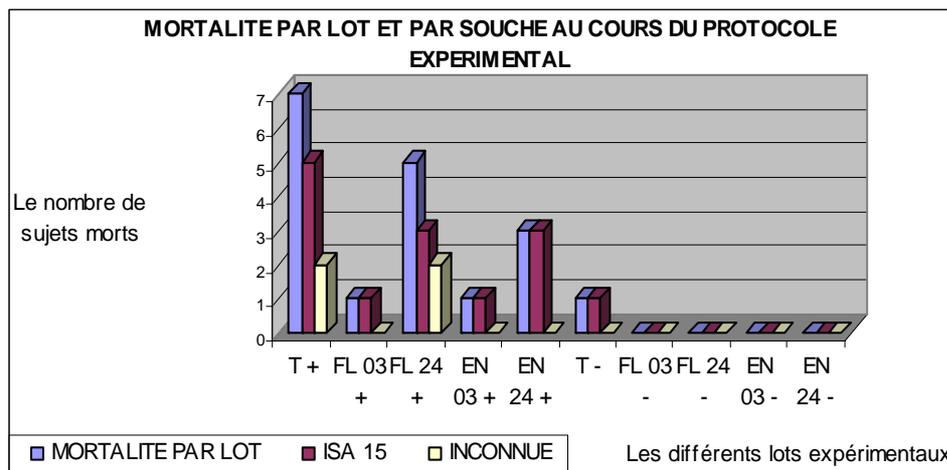


Figure 26 : Mortalité par lot et par souche animale au cours du protocole expérimental

La mortalité survient dans les lots inoculés seulement et touche surtout la Isa 15.

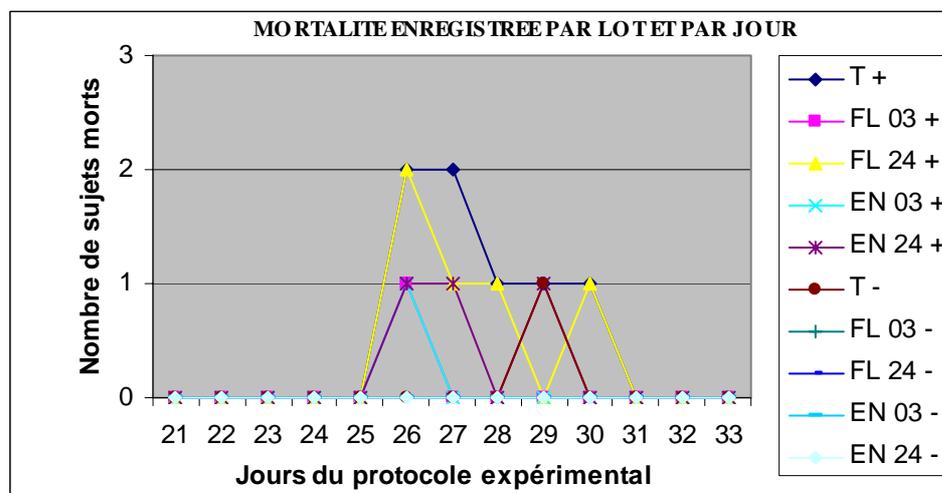


Figure 27 : Mortalité enregistrée par lot et par jour

La mortalité touche les lots inoculés ; elle est très importante pour le lot T+ (inoculé et non traité) et le lot FL24+ (inoculés et traité à la fluméquine sur 24 heures d’abreuvement), et à moindre degrés pour les lots FL03+, EN03+ et EN24+.

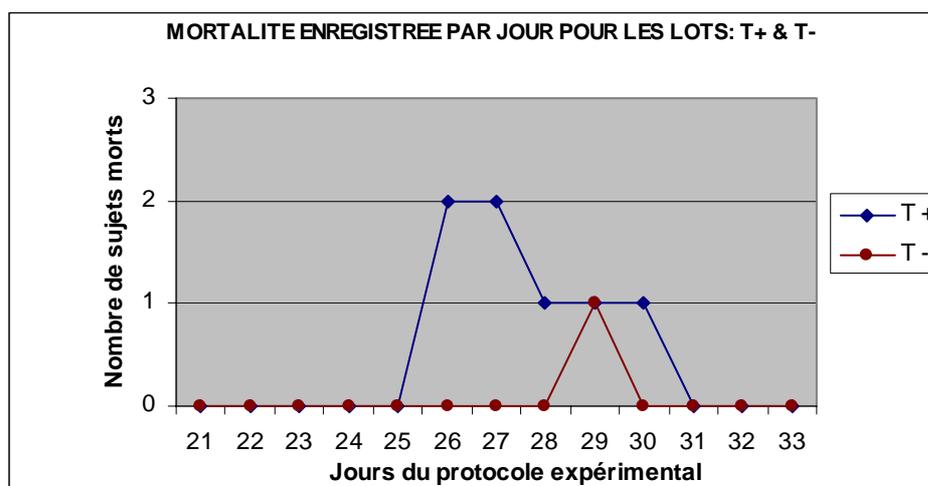


Figure 28 : Mortalité enregistrée par jour pour les lots T+ et T-

La mortalité la plus importante est enregistrée pour le lot T+, quant à la mortalité enregistrée pour le lot T-, elle n'est pas significative (il s'agit d'un cas isolé).

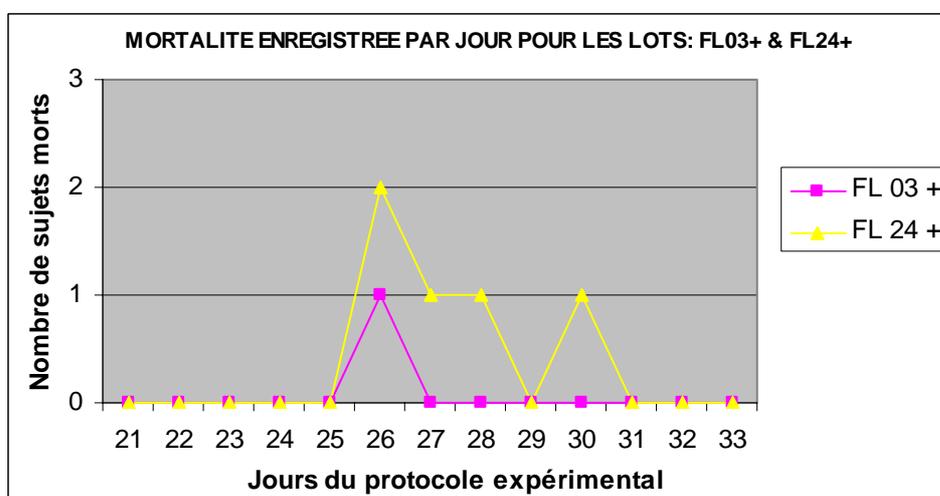


Figure 29 : Mortalité enregistrée par jour pour les lots FL03+ et FL24+

Les sujets recevant la fluméquine sur 24 heures d'abreuvement, présentent une mortalité plus importante que ceux recevant la fluméquine sur 3 heures d'abreuvement.

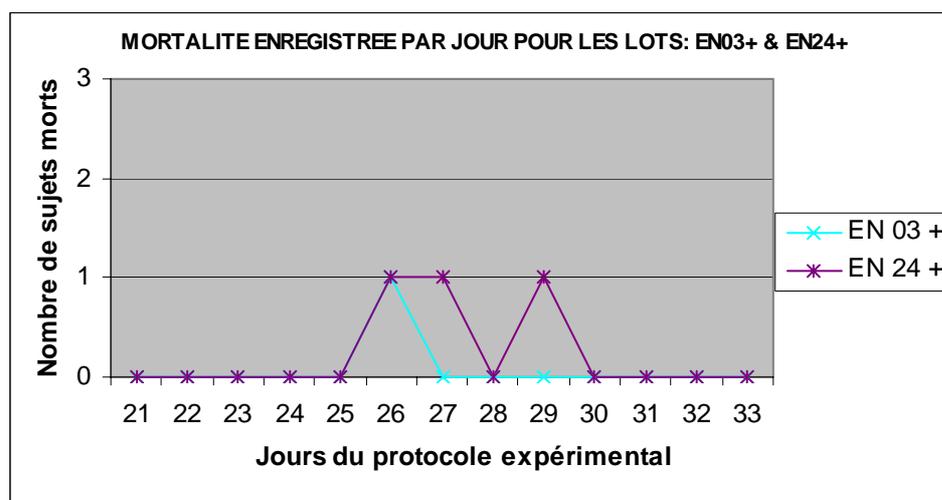


Figure 30 : Mortalité enregistrée par jour pour les lots EN03+ et EN24+

Les sujets recevant l'enrofloxacin sur 24 heures d'abreuvement, présentent une mortalité plus importante que ceux recevant l'enrofloxacin sur 3 heures d'abreuvement.

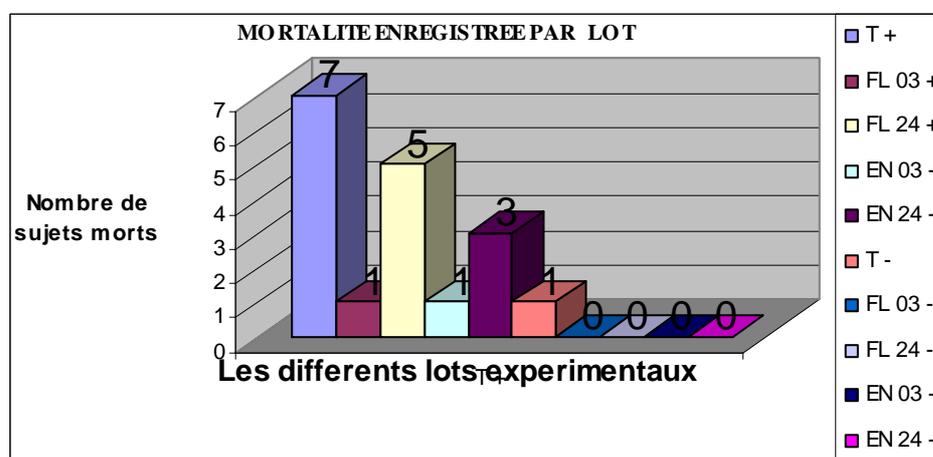


Figure 31 : Mortalité enregistrée par lot.

La mortalité est très importante pour le lot T+ puis, à moindre degré pour les lots FL24+ puis EN24+ et enfin, elle est faible pour les lots FL03+ et EN03+.

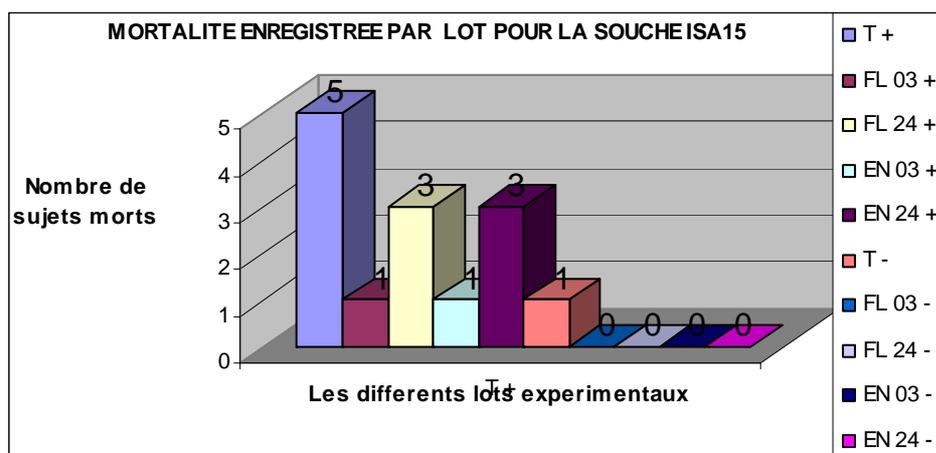


Figure 32 : Mortalité enregistrée par lot pour la souche Isa 15.

Cette figure résume bien les figures 26 et 31 ; la mortalité est importante pour la Isa 15 et touche les lots T+, FL24+ et EN24+.

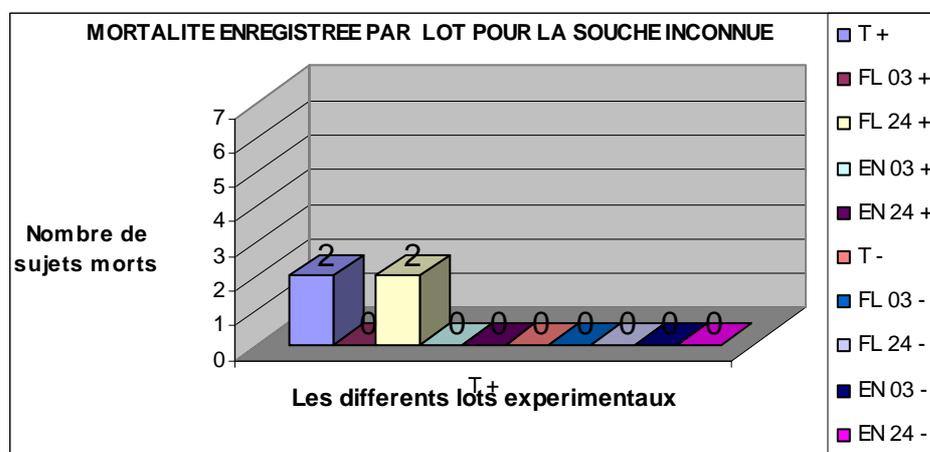


Figure 33 : Mortalité enregistrée par lot pour la souche Inconnue.

La mortalité est moins importante pour la souche inconnue et ne s’observe que pour les lots T+ et FL24+.

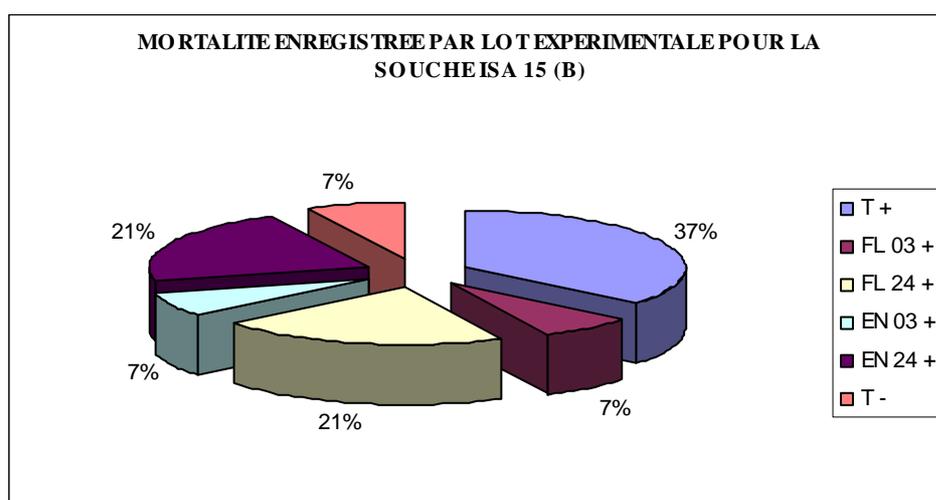


Figure 34 : Mortalité enregistrée par lot expérimentale pour la souche Isa 15 (%).

Le taux de mortalité de la Isa 15 est de : 37% pour le lot T+, 21% pour les lots FL24+ et EN24+ et de 7% pour les lots FL03+ et EN03+.

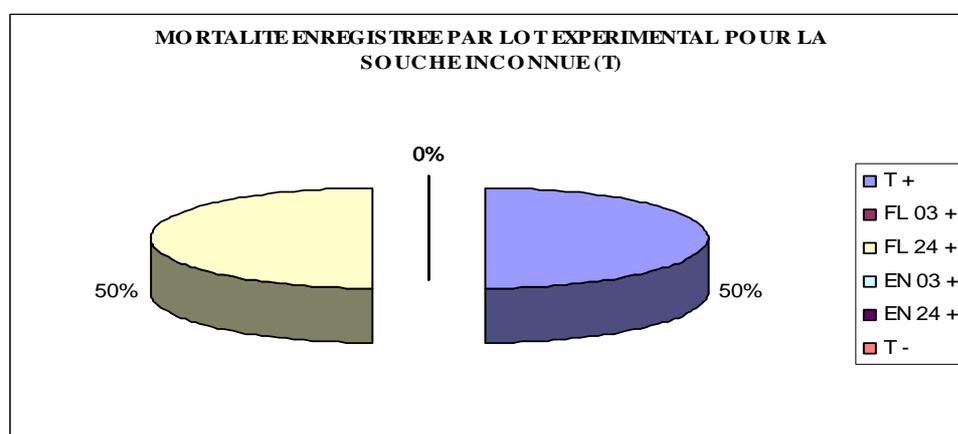


Figure 35 : Mortalité enregistrée par lot expérimentale pour la souche Inconnue (%).

Le taux de mortalité de la souche inconnue est identique pour les lots T+ et FL24+, cependant il reste moins important que celui de la souche Isa 15.

Remarque : C'est en ayant connaissance de la répartition des sujets que l'on a pu apprécier le taux de mortalité par lot expérimental (comme le montre les figures précédentes), par score lésionnel (comme le montre les figures suivantes) et également par souche animale.

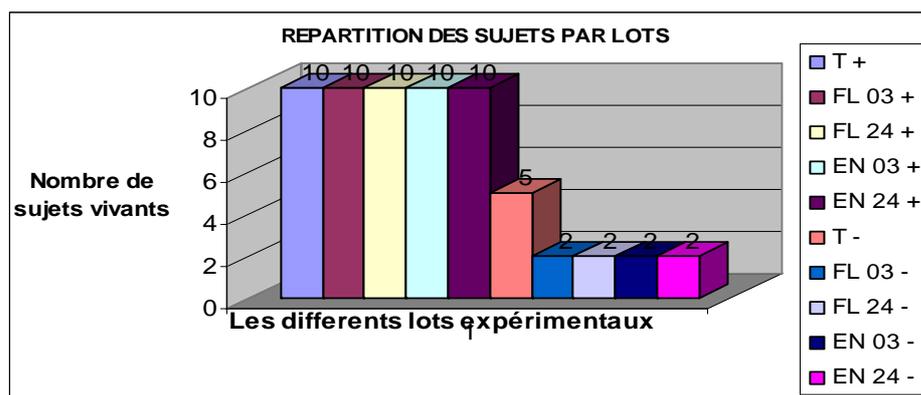


Figure 36 : Répartition des sujets par lot.

Les sujets sont répartis en nombre important pour les lots inoculés (T+, FL24+, FL03+, EN24+, EN03+), de moitié pour le lot T- et en nombre plus réduit pour les lots non inoculés et traités (FL24-, FL03-, EN24-, EN03-).

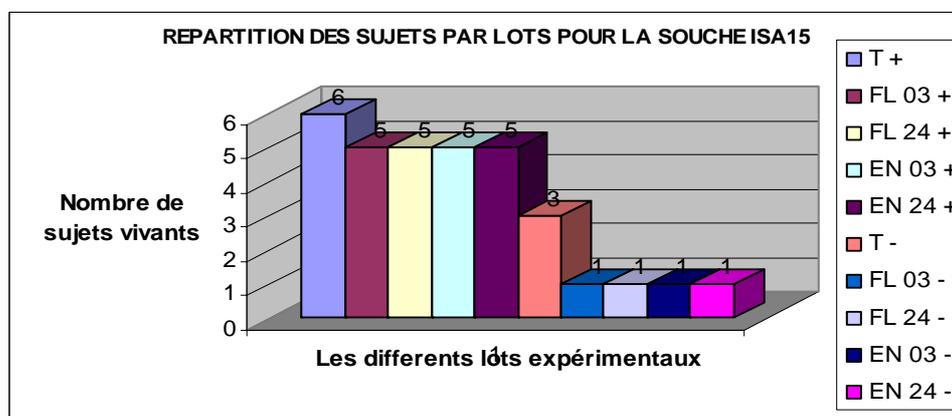


Figure 37 : Répartition des sujets par lot pour la souche Isa 15.

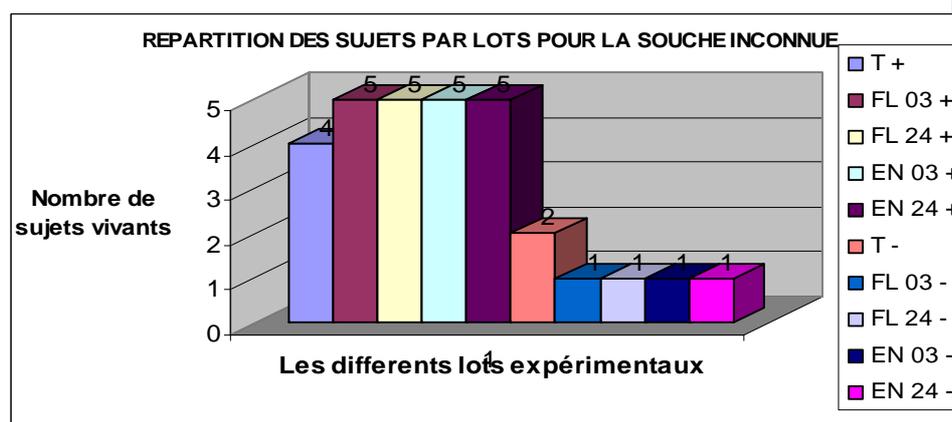


Figure 38 : Répartition des sujets par lot pour la souche Inconnue.

La répartition de la souche Isa 15 par rapport à la souche Inconnue est plus importante pour les lots T+ et T- et se fait à part égale (entre les deux souches animales) pour les lots traités (inoculés et non inoculés). (cf. Figure 37 et 38)

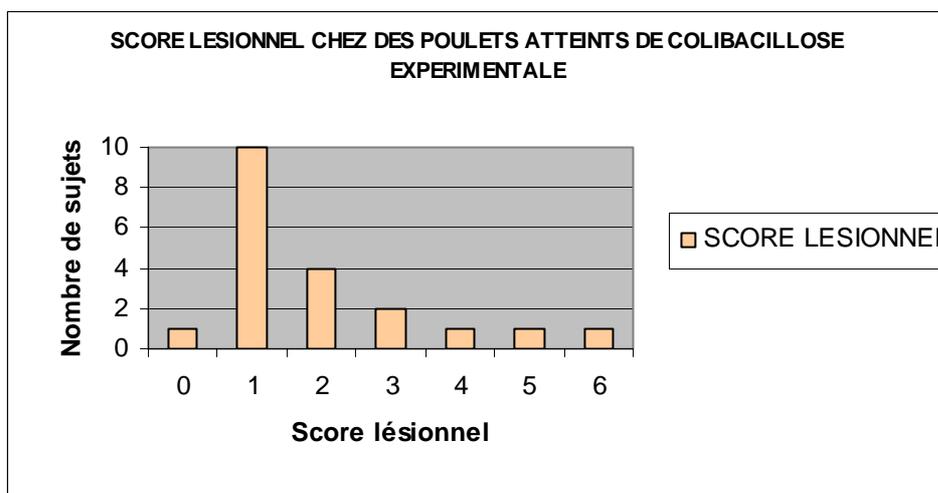


Figure 39 : Score lésionnel chez des poulets atteints de colibacillose expérimentale.

Le nombre de sujets scorés à 1 est plus important puis vient celui des sujets scorés à 2 puis à 3, et à moindre degré celui des sujets scorés à 4, 5 et 6. Quant au sujet scoré à 0, il ne présente aucunes lésions.

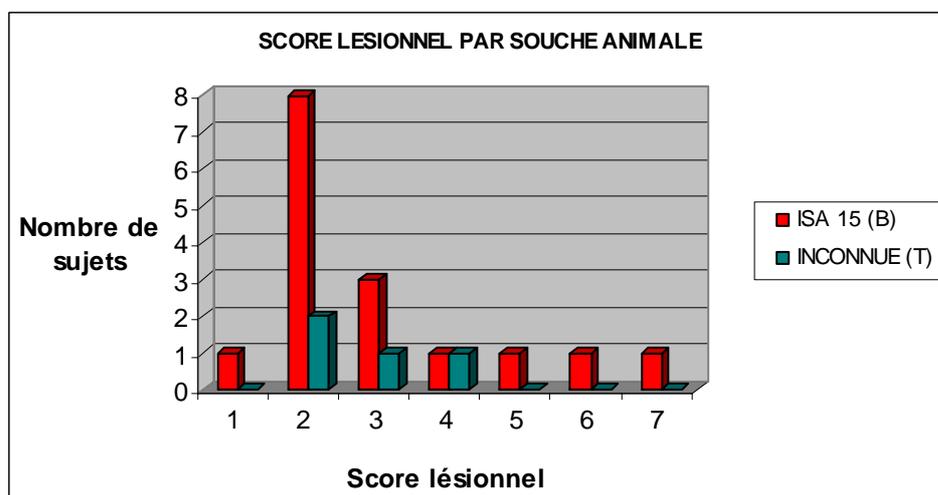


Figure 40 : Score lésionnel par souche animale.

La souche Isa 15 est plus sensible que la souche Inconnue et présente le score lésionnel le plus fort ainsi que le nombre de sujets atteints le plus important.

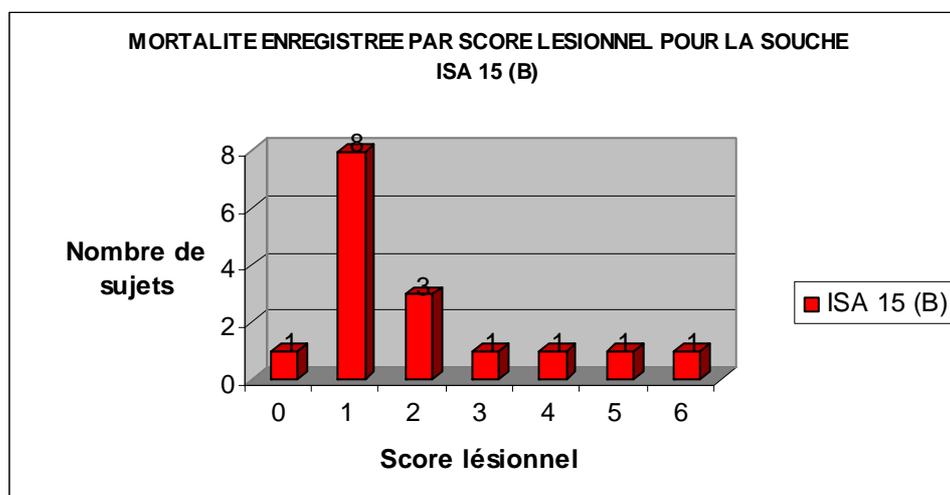


Figure 41 : Mortalité enregistrée par score lésionnel pour la souche Isa 15.

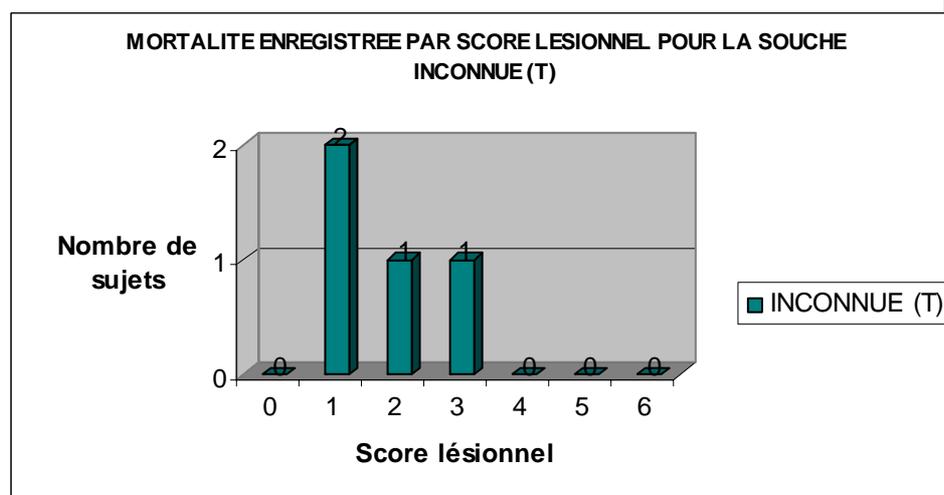


Figure 42 : Mortalité enregistrée par score lésionnel pour la souche Inconnue.

La souche Isa 15 présente les lésions les plus sévères et atteint un score de 6 alors que la souche Inconnue présente des lésions moins sévères pour un score maximal de 3. (cf. Figure 41 et 42)

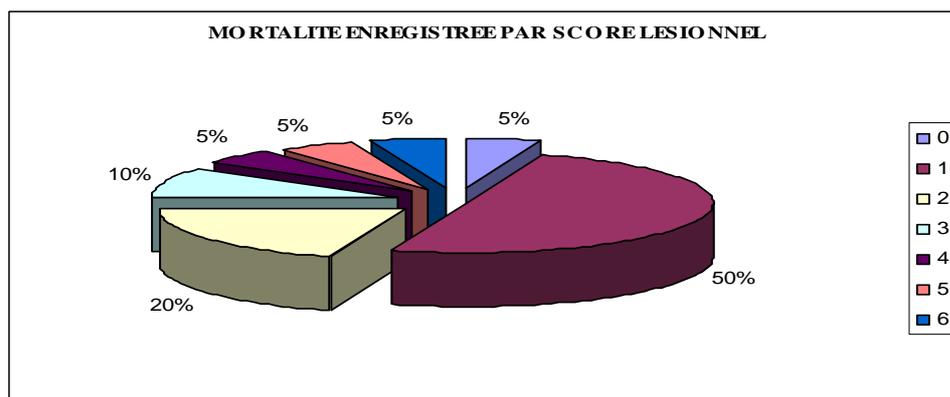


Figure 43 : Mortalité enregistrée par score lésionnel (%).

Il rejoint la Figure 39 et présente un taux de mortalité atteignant 50% pour les sujets scorés à 1, 20% pour ceux scorés à 2, 10% pour ceux scorés à 3 et 5% pour ceux scorés à 4, 5, 6 (et 0).

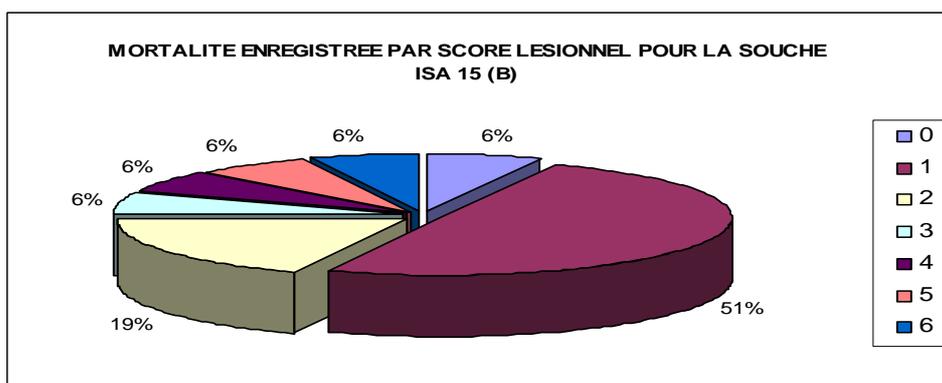


Figure 44 : Mortalité enregistrée par score lésionnel pour la souche Isa 15 (%).

Il rejoint la Figure 41 ; on note un taux de mortalité de 51% pour les sujets scorés à 1, 19% pour ceux scorés à 2 et 6% pour les sujets scorés de 3 à 6.

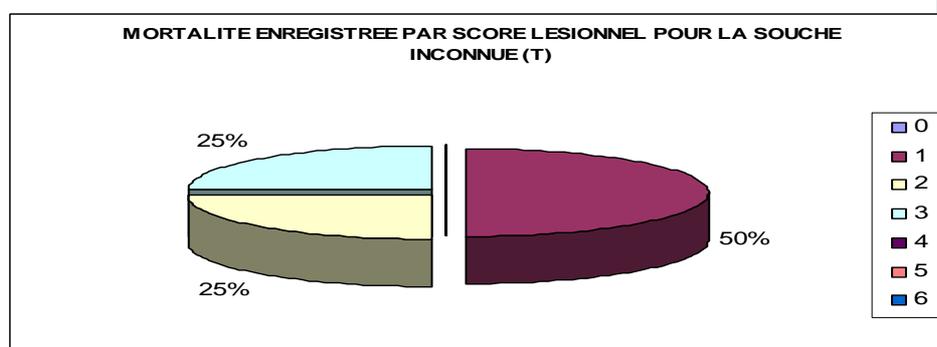


Figure 45 : Mortalité enregistrée par score lésionnel pour la souche Inconnue (%).

Il rejoint la Figure 42 ; on note un taux de mortalité élevé pour les sujets scorés à 1 et à moindre degré pour les sujets scorés à 2 et 3 seulement.

AU NIVEAU DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE

Au cours de cette étude, nous avons pris en considération, que les souches d'*Escherichia coli*, après identification de la flore fécale du poulet de chair; toutes les autres souches isolées et différentes d'*Escherichia coli* après identification, ont été exclues de l'étude.

1. LES PRELEVEMENTS

1.1 Jours De Prélèvement De La Flore Fécale

Des prélèvements sont effectués quotidiennement à partir de lots expérimentaux différents, à des périodes expérimentales bien précises et sur deux souches animales à raison d'un jour sur deux pour chaque souche avec un total de 92 prélèvements dont la provenance est bien définie pour chaque prélèvement. De la période à laquelle fut réalisé un prélèvement va dépendre la nature de la recherche bactériologique ; Prenons comme exemple un prélèvement effectué à J-4 et un autre à J6 : pour le premier, on va identifier la flore fécale et pour le second, on partira à la recherche de notre agent pathogène. (cf. *Annexe 16*)

1.2 Les Prélèvements Effectués

Différents éléments permettent ainsi de définir le but des prélèvements effectués, à savoir : Détermination de la flore fécale et recherche des souches d'*Escherichia coli* (saprophyte ou pathogène), et dépendent donc de la période du protocole (avant ou après inoculation) et des sujets concernés (inoculés ou non). (cf. *Annexe 17*)

2. LA FLORE FECALE

2.1 Identification De La Flore Fécale Et Recherche D'*Escherichia coli*

Pour chaque prélèvement effectué avant l'inoculation (cf. *Annexe 16*), un ou plusieurs germes sont identifiés ; on a donc une flore fécale qui comprend : des *Escherichia coli*, des *Klebsielles*, des *Proteus* et des *Staphylocoques*. Concernant les prélèvements effectués à partir de J0, on ne tiendra compte que de la présence d'*Escherichia coli* ; la présence de *Klebsielles* et d'un seul *Bacille Non-Fermentant* font suite à une erreur de manipulation (lors de l'isolement d'*Escherichia coli*). (cf. *Annexe 18*)

2.2 Les Germes Recherchés

Différents éléments permettent de définir les germes recherchés, ainsi, la flore fécale en général et plus particulièrement *Escherichia coli* furent définis en se basant sur la période du protocole et les sujets concernés (lots expérimentaux) par les prélèvements. (cf. *Annexe 19*)

3. LE SEROTYPAGE

3.1. Identification Des Souches D'*Escherichia coli* Par Le Test Sérologique

Après identification des *E. coli* (cf. *Annexe 18*), on procède à un test sérologique pour mettre en évidence la présence de la souche pathogène inoculée (O78). On en dénombre 22 sur 52 prélèvements d'*E. coli*. (cf. *Annexe 20*)

3.2 Le Test Sérologique

Le sérotypage concerne tous les sujets inoculés pour mettre en évidence la présence de la souche pathogène inoculée (O78), et les sujets du lot T- (non inoculés et non traités) pour mettre en évidence une éventuelle transmission de l'agent pathogène (O78). (cf. *Annexe 21*)

4. L'ANTIBIOGRAMME

4.1 Identification Des Souches Résistantes D'*Escherichia coli* Par L'antibiogramme

Après identification sérologique de tous les germes d'*E. coli* (cf. *Annexe 20*), on procède à l'antibiogramme pour mettre en évidence la présence d'une éventuelle résistance aux quinolones : On note une résistance aux quinolones distribuées sur 24 heures d'abreuvement avec une très forte résistance provenant des lots inoculés et traités sur 24 heures d'abreuvement et prélevée sur les sujets de la Isa 15 seulement. (cf. *Annexe 22*)

4.2 L'antibiogramme

L'antibiogramme s'effectue : Avant inoculation, sur des souches d'*E. coli* provenant du laboratoire (ATCC 25922 et O78) pour une étude in vitro et de l'élevage expérimental (*E. coli* saprophyte) et Après inoculation et traitement, sur des souches d'*E. coli* provenant de tous les sujets traités (pendant et 24 à 48 heures après le protocole thérapeutique) pour une étude in vivo. (cf. *Annexe 23*)

C'est à partir de tous les prélèvements effectués que l'on a pu déterminer les souches d'*Escherichia coli* résistantes aux quinolones ainsi que les facteurs pouvant participer à cette antibiorésistance comme le montre les figures suivantes:

Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

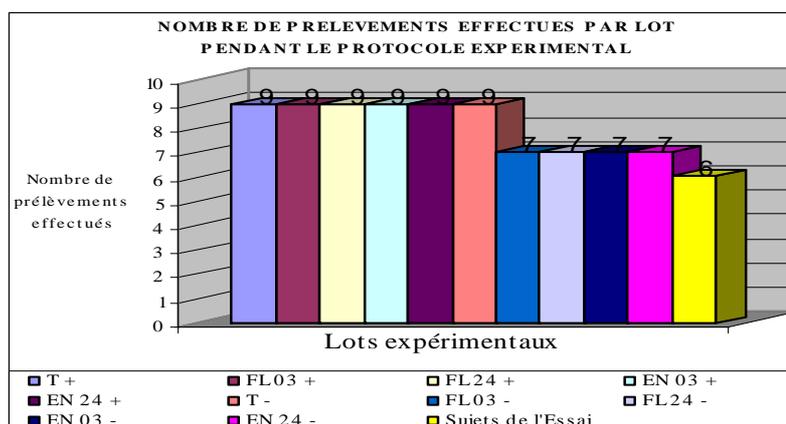


Figure 46 : Nombre de prélèvements effectués par lot pendant le protocole expérimental.

Le nombre de prélèvements s'élève à 92 prélèvements, à raison d'un prélèvement par jour et par lot et dépend des lots expérimentaux : on compte 9 prélèvements pour chacun des lots suivants : T+, FL24+, FL03+, EN24+, EN03+, T- et 7 pour chacun des lots non inoculés et traités (FL24-, FL03-, EN24-, EN03-) et seulement 6 en provenance des sujets vivants de l'essai expérimental. Ce nombre de prélèvement varie d'un groupe de lots à un autre suite aux manipulations que l'on veut réaliser (définir la flore fécale, rechercher la souche O78, rechercher l'antibiorésistance aux quinolones).

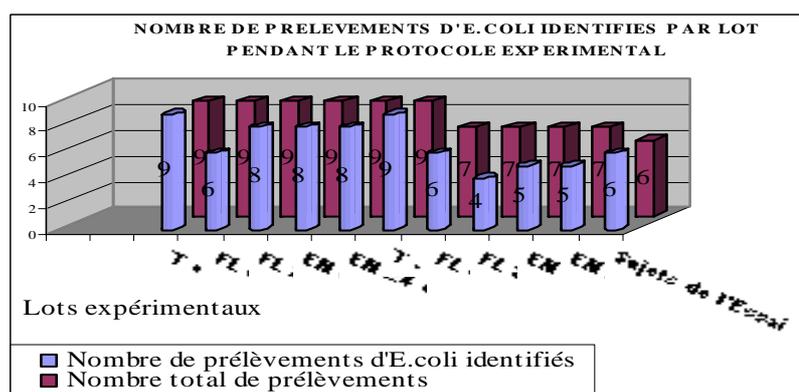


Figure 47: Nombre de souches d'*E. coli* identifiés par lot pendant le protocole expérimental.

E. coli est retrouvée systématiquement dans tous les lots expérimentaux et en nombre important par rapport à la flore fécale : sur un nombre total de 9 prélèvements par exemple, 6 souches d'*E. coli* sont identifiés.

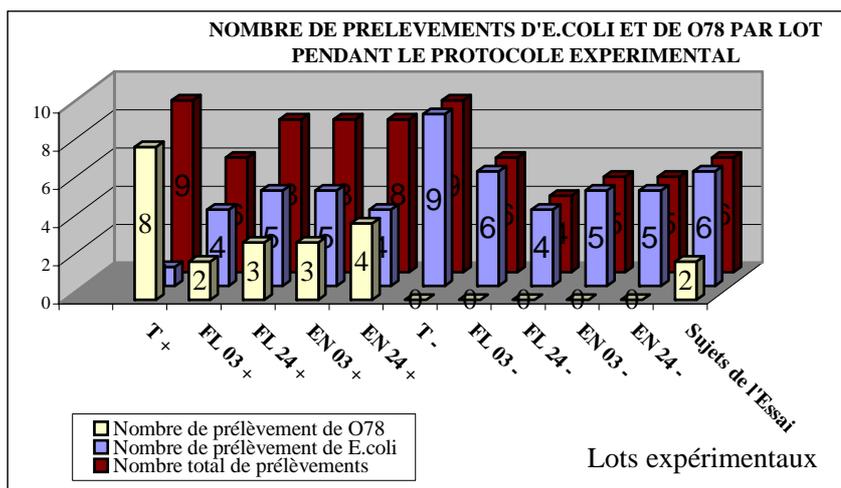


Figure 48: Nombre de prélèvements d’*E. coli* et de O78 par lot pendant le protocole expérimental.

Tous les prélèvements provenant des lots inoculés révèlent la présence de la souche O78, cette dernière est retrouvée en nombre important (par rapport aux *E. coli* saprophytes) seulement pour les lots T+ (inoculé et non traité).

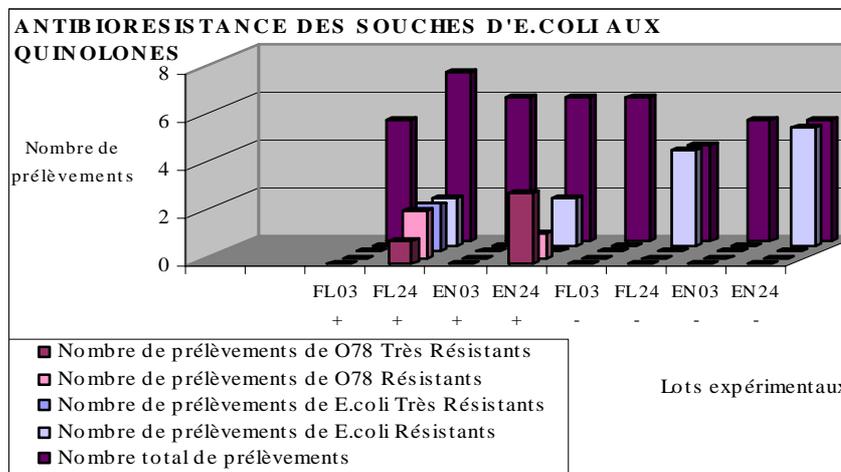


Figure 49: Antibiorésistance des souches d’*E. coli* aux quinolones.

On note une résistance très marquée de la souche O78 et *E. coli* au niveau des lots inoculés et recevant un traitement sur 24 heures d’abreuvement et une résistance des souches d’*E. coli* seulement pour les lots non inoculés et recevant également un traitement sur 24 heures d’abreuvement.

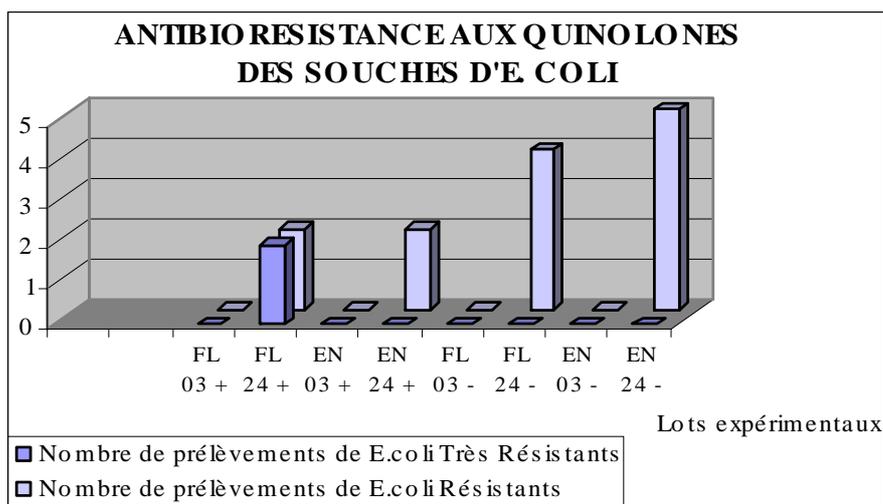


Figure 50: Antibiorésistance aux quinolones des souches d’*E. coli*.

Les souches d’*E. coli* présentent une antibiorésistance pour tous les lots traités sur 24 heures d’abreuvement et une antibiorésistance très importante pour le lot FL24+.

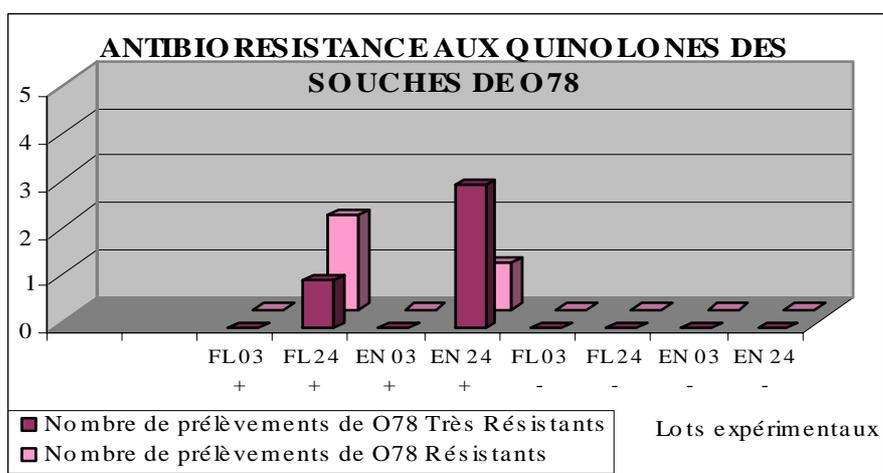


Figure 51: Antibiorésistance aux quinolones des souches de O78.

Les souches de O78 présentent une antibiorésistance uniquement pour les lots inoculés et traités sur 24 heures d’abreuvement. Cette antibiorésistance est très importante également pour ces mêmes lots (FL24+ et EN24+).

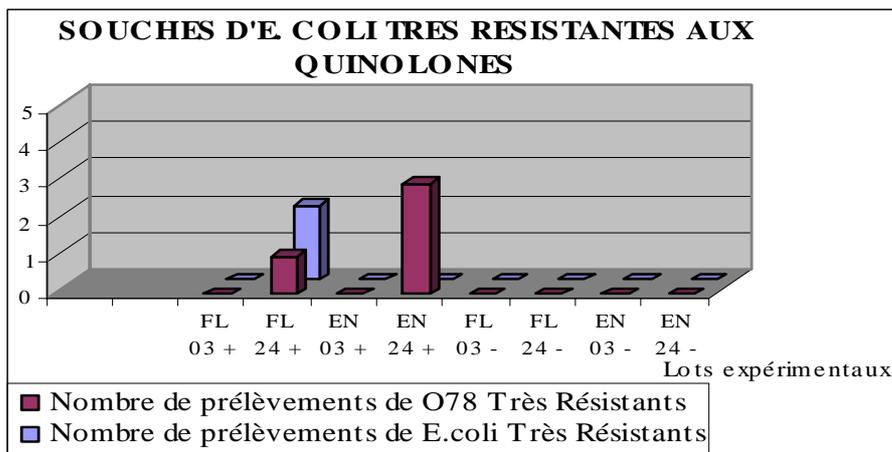


Figure 52 : Souches très résistantes aux quinolones.

Les souches qui ce sont montrées très résistantes aux quinolones proviennent des lots inoculés et traités sur 24 heures d’abreuvement. (cf. Figure 49)

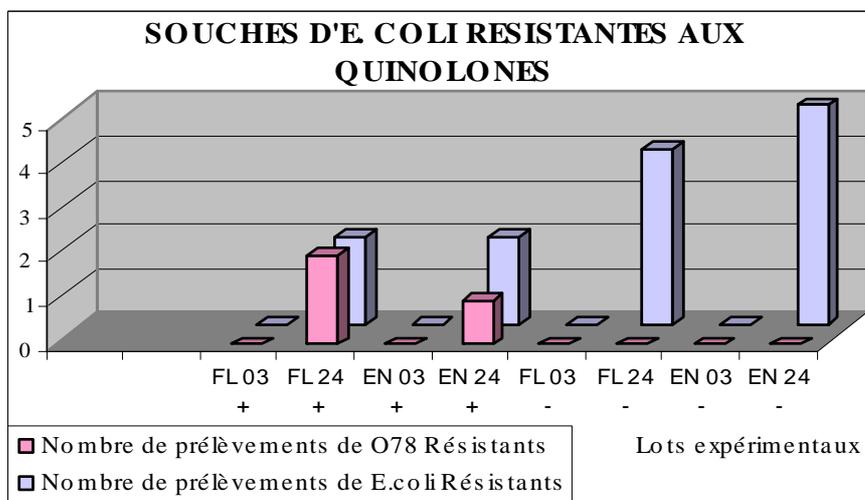


Figure 53 : Souches résistantes aux quinolones.

Les souches résistantes aux quinolones concernent aussi bien les souches d’*E. coli* saprophytes que pathogènes (O78). Les saprophytes proviennent de tous les lots traités sur 24 heures d’abreuvement (inoculés et non inoculés) quant aux pathogènes, elles ne sont retrouvés que dans les lots inoculés et traités sur 24 heures d’abreuvement. (cf. Figure 49)

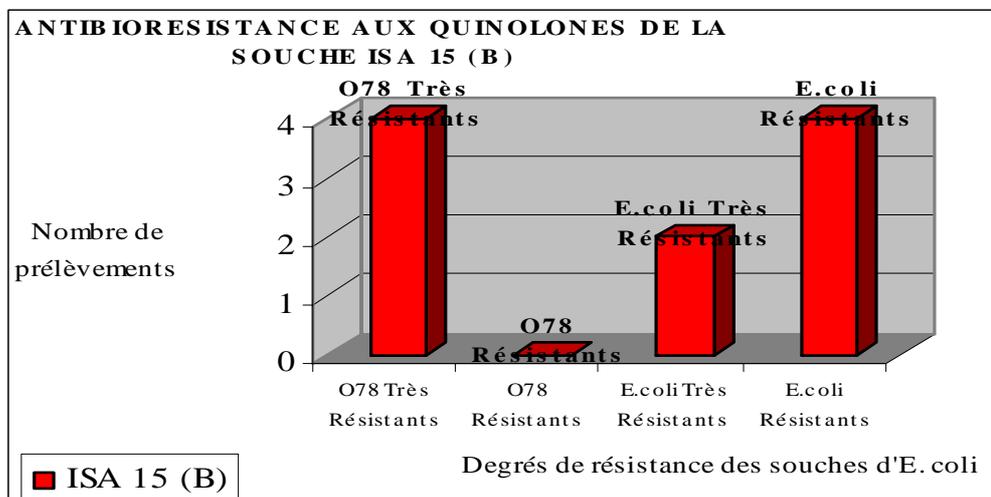


Figure 54 : Antibiorésistance aux quinolones de la souche Isa 15

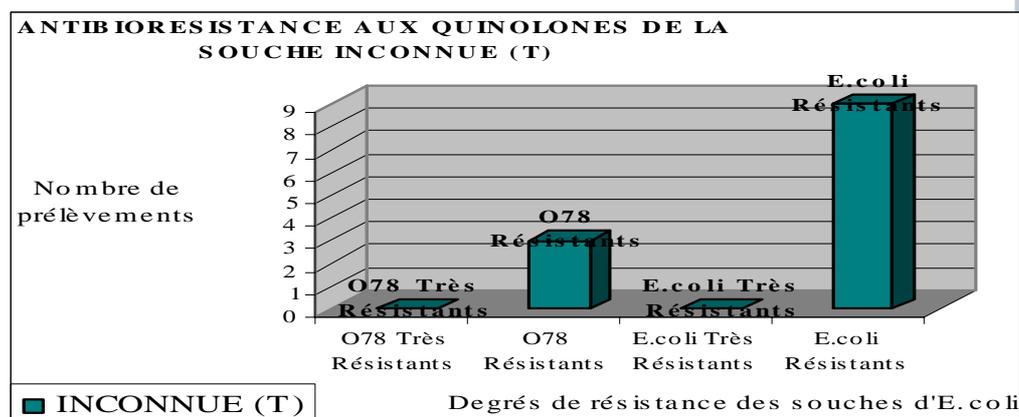


Figure 55 : Antibiorésistance aux quinolones de la souche Inconnue.

Les souches d'*E. coli* pathogènes et saprophytes présentant une résistance sont retrouvées chez les deux souches animales, quant à celles présentant une très forte résistance, elles ne sont retrouvées que chez la Isa 15. (cf. Figure 54 et 55)

DISCUSSION

AU NIVEAU DE L'ELEVAGE EXPERIMENTAL

1. DISCUSSION DES CRITERES D'ETUDE RECUEILLIS LORS DU TEST D'INOCULATION (INOCULUM D'ESSAI)

Les sujets de l'essai expérimental représentent le pilier principal autour duquel s'est déroulé le protocole expérimental (cf. Annexe 5); c'est à travers les symptômes et lésions recueillis que l'on a choisi la dilution approximative qui allait donner l'inoculum final. En effet, juste après l'inoculation de nos suspensions pathogènes à trois dilution (1/2), (1/5) et (1/10) sur les trois sujets de l'essai expérimental (A), (B) et (C) respectivement, un premier résultats est apparu : le sujet qui a reçu la dilution d'1/2 est mort brutalement sans prodrome dans les 6 heures qui ont suivies et est scoré à 1; pour celui qui a reçu la dilution d'1/5, il est mort 48 heures après l'inoculation et a présenté des signes de prostration seulement. Quant au troisième sujet qui a reçu la dilution d'1/10, il n'a présenté aucun symptôme. Suite à cela, le choix de la dilution à utiliser pour l'inoculum final ne pouvait être que celle de 1/5. (cf. Annexe 9,10, 11, 12, 13 et 14)

2. DISCUSSION DES CRITERES D'ETUDE RECUEILLIS LORS DE L'INOCULATION PROPREMENT DITE (INOCULUM FINAL):

Les résultats obtenus de la mortalité, de prostration, de score lésionnel et de croissance confirment l'intérêt clinique du mode d'administration sur 3 heures d'abreuvement par rapport au mode continu (de 24 heures). En effet, le mode d'administration a une grande importance puisque la mortalité touche surtout les lots traités sur 24 heures d'abreuvement. (cf. Figure 27, 29, 30 et 31)

A l'arrivée des oiseaux, des éléments énergétiques (tels que le sucre) et des sels minéraux (Effydral) sont administrés dans l'eau de boisson pour les tonifier et éviter tout trouble hydro-électrolytique. Un complément minéralo-vitaminé est également ajouté soit dans l'eau de boisson (Vital-C) soit dans l'aliment (Bellavet-G) selon le rythme d'abreuvement et l'appétit des oiseaux ; ce complément va d'une part enrichir l'aliment et favoriser leur croissance et d'autre part, permettre aux oiseaux de combattre le stress thermique et celui de la vaccination. Cependant, le protocole de vaccination prévu contre la maladie de New Castle (Pestos) et la maladie de Gumboro (Gumboral) n'a pas pu être réalisé suite aux fortes chaleurs. (cf. Annexe 2)

Les traitements sont instaurés dans l'eau de boisson 48 heures après l'inoculation et la durée du traitement pour la fluméquine prévue pour 3 jours est prolongée jusqu'à 5 jours suite à la forte morbidité représenté par un état de prostration avec difficulté de déplacement voire même l'inertie ; quant à l'enrofloxacin, elle est distribuée pendant 3 jours seulement. Les doses calculées respectent la posologie de la molécule et dépendent du poids des animaux par lots et de la quantité exacte d'eau consommée, et sont administrées dans une eau minérale (pour éviter toute altération du produit thérapeutique) assurant une dose thérapeutique efficace et évitant ainsi tout échec. (cf. Annexe 2, 4, 7 et 8)

Le mode d'administration tient compte du rythme d'abreuvement qui diminue chez les sujets prostrés échappant ainsi au traitement.

Suite à la canicule qui s'est abattue sur les poulets de chair en début d'élevage, les animaux étaient moins énergétiques et ne s'abreuyaient et ne s'alimentaient que pendant les périodes de fraîcheur (tôt le matin et tard le soir) ce qui explique clairement la progression lente de la courbe de consommation d'eau et d'aliment ainsi que le retard de croissance qui s'est fait ressentir par la suite. Vient s'ajouter à cela, le symptôme de prostration observé après reproduction de la colibacillose expérimentale, qui affecte considérablement la consommation d'eau et d'aliment. (cf. Annexe 1 et Figure 22)

La mortalité est relevée chaque jour, pendant toute la période de l'élevage expérimental et permet d'apporter une explication en se référant à la période d'élevage correspondante : on note donc un taux de mortalité de 34% pour une période allant du début d'élevage jusqu'au début du protocole expérimental et un taux de 20% pour une période allant du début du protocole expérimental jusqu'à la fin du protocole expérimental. La mortalité enregistrée au cours de la première période fait suite au stress du transport et à la canicule (le changement alimentaire s'étant fait progressivement n'a pas affecté les oiseaux) ; pour celle enregistrée au cours de la deuxième période, elle fait suite aux effets de l'agent pathogènes inoculés qui sont plus ou moins atténués par le traitement instauré. A la fin du protocole expérimental, on recense un taux de mortalité de 54% (sans inclure les sujets sacrifiés dont le taux atteint 11%). (cf. Annexe 3 et 11 et Figure 23, 24 et 28)

On note des lésions de colisepticémie avec une atteinte purement hépatique et rénale qui donnent l'impression que le foie et les reins sont les seuls organes cibles de l'agent pathogène (O78) ; vient s'ajouter à cela, une atteinte nerveuse représentée par un port de la tête anormal (l'animal vacille de la tête), un maintien en station debout difficile qui évolue rapidement et dans les heures qui suivent vers la paralysie des membres puis les convulsions. L'animal couché sur le côté présente des signes de pédalage qui surviennent en crises périodiques. Dans les cas les plus sévères, l'animal succombe à ces crises.

Le score lésionnel établi permet d'évaluer l'extension des lésions ainsi que les organes cibles. Contrairement à ce qui a été rapporté par la littérature, il n'y a pas d'atteinte respiratoire, digestive (intestinale) ou cardiaque. Les lésions sont concentrées sur le foie, avec une atteinte ou non de la rate et touche également l'appareil urinaire (congestion des reins avec un dépôt d'urates dans les uretères). Quant au système nerveux, il ne s'exprime que par les symptômes observés de titubation, paralysie et convulsions. (cf. Figure 39)

Les sujets présentant un état de prostration plus marqué (allant de la simple prostration vers l'état de convulsion) ont atteint le score lésionnel le plus haut ; en effet, tous les sujets scorés à 5 présentent des lésions de congestion hépatique importante avec hypertrophie et dépôt de fibrine épais recouvrant le foie, et ceux scorés à 6 présentent une congestion rénale importante avec un dépôt d'urates ; et ne s'observent que chez les sujets de la souche animale Isa 15 d'où un taux de mortalité plus élevé que la souche Inconnu. (cf. Annexe 9, 10, 12, 13, 14 et 15 et Figure 25, 26, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 et 40)

On est arrivé à la même réflexion faite par Mogenet *et al.*, 1997, à savoir que « l'inoculation par voie intra-musculaire profonde de *E. coli* O78:K80 a déclenché une colisepticémie d'évolution rapide. En plus de la voie d'inoculation, la dose de l'inoculum et la pathogénicité de la souche semblent en être les déterminants principaux ».

Cette pathogénicité s'explique par le fait que la O78 est un agent pathogène immunodépresseur, selon Lecoanet, 1992, et qui agit sur les jeunes mâles qui sont prédisposés à la pathologie et donc à l'agent pathogène immunodépresseur, selon Turqi, 2000.

Cette colibacillose semble être liée à un autre facteur, celui de la souche animale ; en effet, elle s'exprime mieux sur la Isa 15 qui atteint un score lésionnel élevé (6), et de façon plus atténuée sur la souche inconnue qui semble plus résistante. (cf. Figure 41, 42, 43, 44 et 45)

Le mode d'administration de l'anti-infectieux est un autre critère d'appréciation puisque tous les lots traités sur 24 heures d'abreuvement ont présentés un taux élevé de mortalité comparé à celui des lots traités sur 3 heures d'abreuvement. Selon Borne, 1995 (cité par Mogenet *et al.*, 1997), cela s'explique par une concentration plasmatique élevée (x2) de la fluméquine atteinte 4 heures après le début d'une administration sur 3 heures d'abreuvement.

La fluméquine est un anti-infectieux couramment prescrit en traitement de la colibacillose d'autant plus qu'il est très efficace dans la colisepticémie à dose concentrée (sur 3 heures d'abreuvement), ce qui fait toujours de lui un traitement de référence.

AU NIVEAU DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE

1. DISCUSSION DES RESULTATS DU TEST SEROLOGIQUE :

Sur la base des prélèvements effectués et après identification de la flore fécale et des souches d'*Escherichia coli*, on part à la recherche de la souche pathogène inoculée. (cf. Annexe 16, 17, 18 et 19 et Figure 46 et 47)

Les tests d'agglutination sur lame en présence du sérum spécifique à *E. coli* O78:K80 qui ce sont révélés positives, prouvent la présence de la souche pathogène dans la flore fécale et donc de la réussite de l'inoculation. Ils permettent de différencier les souches d'*E. coli* pathogènes des saprophytes, ce qui nous amène à la constatation suivante : Les sujets servant de Témoin négatif (non inoculés et non traités) placés à coté des sujets servant de Témoin positif (inoculés et non traités) n'ont révélés aucune présence de la souche pathogène dans leur flore fécale, ce qui prouve qu'il n'y a eu aucune contamination de ces sujets, ni par voie aérienne (ce qui rejoint l'absence d'une atteinte de l'appareil respiratoire) ni par d'autres voies (ce qui prouve que les règles d'hygiène furent respectés). (cf. Annexe 20 et 21 et Figure 48)

Le prélèvement de la flore fécale se révèle un moyen rapide dans l'établissement d'un diagnostic clinique, cependant, il reste délicat du fait de l'incertitude de l'abondance de la souche pathogène dans la flore fécale car sur 92 prélèvements effectués, seulement 78 prélèvements ont mis en évidence la présence d'*E. coli* dont 22 prélèvements pour la O78. Pour ce qui est de la souche saprophyte, il est normal de la retrouver systématiquement mais est-ce toujours le cas pour la souche pathogène (O78) ? Nous ne pouvons pas apporter de réponse à cette question.

2. DISCUSSION DES RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME (IN VITRO) :

D'après Al-said Mustafa, 2001 et Rifaat Khodari, 2001, Un test de sensibilité doit être réalisé avant d'entreprendre tout traitement pour éviter l'échec thérapeutique et donc assurer de meilleurs résultats thérapeutiques.

Les résultats obtenus des antibiogrammes (sur les quinolones et autres anti-infectieux) réalisés sur la souche O78 in vitro (avant son inoculation) sont très révélatrices et laissent espérer un traitement efficace et par conséquent, un taux de mortalité diminué ; il en est de même pour les souches saprophytes (*E. coli* provenant de l'élevage avant inoculation de l'agent pathogène et traitement à la fluméquine et à l'enrofloxacin) qui montrent la même sensibilité aux quinolones que la O78. (cf. Annexe 23). (Al-said Mustafa, 2001 ; Rifaat Khodari, 2001)

3. DISCUSSION DES RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME (IN VIVO) :

Les résultats fournis par les deux séries d'antibiogramme sur les quinolones réalisés sur des souches d'*E. coli* (pathogène et saprophytes) après inoculation et traitement nous ont fortement surpris, d'une part par la découverte, lors de la lecture des antibiogrammes, de « disques complètement fermés » signe d'une **très forte résistances aux quinolones** ; et d'autre part, de constater que cette très forte antibiorésistance touche aussi bien la souche pathogène qui s'est montrée sensible au départ (in vitro) que la souche saprophyte . De plus, les autres souches résistantes, en dehors des souches pathogènes, proviennent des prélèvements effectués sur les lots traités et inoculés ainsi que les lots traités et non inoculés. (cf. Figures 49, 50, 51, 52 et 53)

Concernant les souches pathogènes ou saprophytes présentant une **très forte** antibiorésistance aux quinolones, elles proviennent de deux lots seulement : le lot inoculé et traité à la fluméquine sur 24 heures d'abreuvement et le lot inoculé et traité à l'enrofloxacin sur 24 heures d'abreuvement ; ces souches proviennent également des prélèvements effectués sur la Isa 15 seulement (l'autre souche animale = la souche inconnue a présenté une antibiorésistance mais pas aussi spectaculaire que celle de la Isa 15). (cf. Annexe 6, 22 et 23 et Figure 54 et 55)

Sur la base de toutes ces constatations, on peut émettre l'hypothèse de la présence de facteurs favorisant l'apparition de cette antibiorésistance, que l'on résume dans le tableau qui suit ; on retiendra également le facteur climatique, puisque notre élevage expérimental s'est déroulé en été.

Tableau 64: Facteurs Favorisant L'apparition De L'Antibiorésistance

Facteurs liés au climat	Température élevée (perturbation du rythme d'abreuvement).
Facteurs liés à la souche animale	La souche animale Isa15 est plus sensible que la souche Inconnue.
Facteurs liés à la souche bactérienne	<i>E. coli</i> pathogène (O78) transmet sa résistance aux souches saprophytes.
Facteurs liés à l'antibiotique	Administration : Mode (en 24 heures) / Dose (diminuée suite à l'état de prostration).

Ceci rejoint ce que certains auteurs ont constaté également :

➤ Sur les facteurs liés à l'antibiotique :

Selon Bezille et Borne, 1996 (cités par Mogenet *et al*, 1997), la fluméquine distribuée sur 3 heures d'abreuvement est plus efficace en traitement de la colibacillose que sur un mode continu de 24 heures.

Selon Brown, 1996 ; Mogenet et Fedida, 1997, cette résistance dépend de certains paramètres de la molécule d'antibiotique administrée (nature, durée et concentration de la quinolone administrée)

Selon Rifaat Khodari, 2001, le sous-dosage est l'un des facteurs majeurs conduisant à l'échec thérapeutique.

➤ Sur le facteur lié au climat :

Il rejoint les facteurs liés à l'antibiotique (facteur de sous-dosage).

➤ Sur le facteur lié à la souche bactérienne :

Selon Brown, 1996 ; Mogenet et Fedida, 1997, cette résistance dépend de l'espèce bactérienne étudiée.

Quant à pouvoir dire si ces facteurs agissent seuls ou en association, on se base sur les résultats provenant des lots inoculés et traités en les comparant à ceux provenant des lots non inoculés et traités ; on constate qu'en plus du mode d'administration et de la souche animale (qui sont communs aux deux types de lots), il faut ajouter un troisième facteur celui de la souche bactérienne (lots inoculés) pour confirmer cette association et parler d'une éventuelle triade. L'agent pathogène a transmis sa résistance aux souches saprophytes chez les sujets sensibles (Isa 15) d'où l'apparition de cette très forte antibiorésistance chez ces derniers (comparés aux autres) et affectant aussi bien les souches pathogènes que saprophytes ; ceci rejoint les résultats obtenus par Mellata *et al.*, 1998. Quant à l'antibiorésistance retrouvés chez tous les sujets traités (inoculés ou non) sur 24 heures d'abreuvement, on pense que cela est lié directement à l'antibiotique et que le facteur incriminé en plus du mode de distribution est la molécule elle-même, puisque les anti-infectieux comme la fluméquine peuvent favoriser la sélection de mutants résistants, selon Courvalin *et al.*, 1985 et Smith, 1986 (cités par Mogenet *et al.*, 1997).

Les objectifs, fixés au début de cette étude expérimentale, sont ainsi atteints et peuvent être résumés comme suit:

➤ 1^{er} objectif : Comparer l'efficacité thérapeutique de deux quinolones (la fluméquine et l'enrofloxacin) :

La fluméquine administrée sur 3 heures d'abreuvement s'est montrée efficace contre la colibacillose aviaire expérimentale (colisepticémie) ; il en est de même pour l'enrofloxacin qui a montré les mêmes résultats au même mode d'administration.

➤ 2^{ème} objectif : Rechercher l'émergence d'antibiorésistance aux quinolones:

L'antibiorésistance a fait son apparition sur tous les lots recevant ces deux quinolones sur 24 heures d'abreuvement et s'est montrée plus importantes pour les lots inoculés et les sujets de la Isa 15.

➤ 3^{ème} objectif : Répondre aux 4 questions posées :

- La relation entre le traitement per os et la résistance réside dans le mode d'administration de l'anti-infectieux (sur 24 heures d'abreuvement).
- Les souches d'*E. coli* concernées par l'antibiorésistance touchent aussi bien les souches pathogènes que saprophytes.

- Les facteurs influençant, responsables de cette antibiorésistance sont rassemblés dans le tableau 64.
- Le moyen d'éviter cette antibiorésistance chez le poulet de chair reste délicat, car il dépend de plusieurs facteurs. Concernant les éléments sur les quels on peut agir, les moyens de lutte à entreprendre sont :
 - Respecter les doses thérapeutiques ;
 - Distribuer l'anti-infectieux sur 3 heures d'abreuvement ;
 - Eviter l'élevage en été ;
 - Choisir une souche animale rustique ;

Sans oublier un élément primordial (qui peut éviter l'échec thérapeutique), celui d'assurer une bonne conduite de l'élevage, à savoir :

- Respecter les normes d'hygiène (Nettoyage régulier du matériel d'élevage surtout des mangeoires et abreuvoirs dans lesquels on peut ajouter des anti-infectieux);
- Respecter les normes d'élevage (Assurer une distribution des mangeoires et abreuvoirs en nombre adéquat pour en faciliter l'accès à tous les oiseaux).

Pour ce qui est de la souche bactérienne, cette dernière est en perpétuel changement et ses mutations engendrent de nouveaux mécanismes de résistance ; c'est pourquoi, il faut être plus vigilant dans l'instauration d'un schéma thérapeutique.

A travers ces résultats (et en la comparant à l'enrofloxacin), on peut définir le schéma thérapeutique le plus adapté pour la fluméquine dans le traitement de la colibacillose aviaire : Distribuée sur 3 heures d'abreuvement (à dose concentrée), la fluméquine reste un traitement de référence dans la colisepticémie.

CONCLUSION

Au cours de cette étude, on a pu établir une relation entre l'apparition d'une antibiorésistance aux quinolones chez *Escherichia coli* de la flore fécale du poulet de chair et l'utilisation des deux molécules de quinolones (Fluméquine et Enrofloxacin).

On a constaté que l'émergence de cette antibiorésistance est tout d'abord, de type extrinsèque ou acquise (C'est-à-dire, qu'elle affecte une population bactérienne initialement sensible et devenant résistante après contact avec l'antibiotique) et qu'elle concerne aussi bien les souches d'*Escherichia coli* commensales que pathogènes.

L'influence d'un traitement oral à la fluméquine sur la résistance aux quinolones en général et à la fluméquine en particulier est établi. De plus, plusieurs facteurs semblent contribuer à l'apparition de ces souches résistantes et sont liés soit à la molécule (mode d'administration), soit à la souche bactérienne (O78:K80), soit à la souche animale (souche Isa 15).

A partir du moment où les sujets montrent une antibiorésistance ou la développent, il faut veiller à ce que les quinolones soient utilisées avec modération et pertinence.

L'apparition de bactéries résistantes aux quinolones chez les animaux constitue un risque pour la santé humaine car ces bactéries peuvent transmettre cette résistance à des bactéries potentiellement pathogènes en l'occurrence à celles de la flore digestive puisque soumise à la présence d'antibiotiques lors de traitements. Une surveillance de l'antibiorésistance s'impose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Acha P.N. et Szyfres B., 1989

Colibacillose.

Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, 2ème édition, O.I.E., 1989, 49-55.

2. Adesiyun A.A., and Kaminjolo J.S., 1992

Susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic and non-diarrhoeic livestock in Trinidad.

Revue Elev. Méd. Pays trop., 1992, 45 (3/4), 260-262.

3. Al-said Mustafa A-S., 2001

Antimicrobial susceptibility test.

Poultry Middle East and North Africa, 23rd year Nbr. 156, Jan.-Feb. 2001, 47-48.

4. Andral B., Fach P., Aspan A., Pérelle S., Lazizzera C. et Pichoire M., 2004

Recherche d'*Escherichia coli* productrice de shiga toxines : Bilan d'une étude réalisée en abattoir portant sur *E. coli* O157:H7.

Bulletin des GTV, N° 25, Mai/Juin 2004, 485-491.

5. Anonyme 1, 1994

API 20 E Réf. 20 190.

Catalogue Analytique, 3ème édition, Mars 1994, BIOMERIEUX, S.A.

6. Anonyme 2, 2002

API 20 E Réf. 20 100 / 20 160.

Notice, 07584D, 2002/10, BIOMERIEUX, S.A.69280 Marcy-l'Etoile, France p1.

7. Anonyme 3, 1985

Numération de l'inoculum.

Diagnostics Pasteur, édition 1985, 4-5.

8. Anonyme 4, 2003

Mode opératoire : fiche technique n°1 (Bactéries non exigeantes).

Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S., 2^{ème} édition, 2003, P. 19.

9. Anonyme 5, 1986 (a)

Bactériologie / Milieux de culture.

Classeur BIOMERIEUX, édition 1986, p. 18.

10. Anonyme 5, 1986 (b)

Bactériologie / Milieux de culture ;

Classeur BIOMERIEUX, édition 1986, p. 21.

11. Anonyme 5, 1986 (c)

Bactériologie / Milieux de culture.

Classeur BIOMERIEUX, édition 1986, p. 34.

12. Anonyme 5, 1986 (d)

Bactériologie / Milieux de culture.

Classeur BIOMERIEUX, édition 1986, p. 57.

13. Anonyme 5, 1986 (e)

Bactériologie / Milieux de culture.

Classeur BIOMERIEUX, édition 1986, p. 59.

14. Anonyme 5, 1986 (f)

Bactériologie/Antibiogramme.

Classeur BIOMERIEUX, édition 1986, 125.

15. Anonyme 6, 1985

Contrôle de Qualité.

Antibiogramme Pasteur, édition 1985,8.

16. Anonyme 7, 2003 (a)

Table de lecture 1a : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Humaine, 3^{ème} édition, 2003, 64.

17. Anonyme 7, 2003 (b)

Table de lecture 5 : Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Humaine, 3^{ème} édition, 2003, 73-74.

18. Anonyme 7, 2003 (c)

Table de lecture 6 : Valeurs critiques pour les molécules antibiotiques ne figurant pas sur les tables du NCCLS d'après le communiqué du Comité Français de l'Antibiogramme Mars 2003.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Humaine, 3^{ème} édition, 2003, 75.

19. Anonyme 8, 2003 (a)

Table de lecture 1a : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Vétérinaire, 2^{ème} édition, 2003, 59.

20. Anonyme 8, 2003 (b)

Table de lecture 4 : Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Vétérinaire, 2^{ème} édition, 2003, 64.

21. Anonyme 8, 2003 (c)

Table de lecture 5 : Valeurs critiques pour les molécules antibiotiques ne figurant pas sur les tables du NCCLS d'après le communiqué du Comité Français de l'Antibiogramme Janvier 2003.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Vétérinaire, 2^{ème} édition, 2003, 65.

22. Anonyme 9, 2005 (a)

Table de lecture 1: Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries (espèces aviaires).

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Humaine, 3^{ème} édition, 2005, 72.

23. Anonyme 9, 2005 (b)

Table de lecture 11: Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Humaine, 3^{ème} édition, 2005, 82.

24. Anonyme 9, 2005 (c)

Table de lecture 12 : Valeurs critiques pour les molécules antibiotiques ne figurant pas sur les tables du NCCLS d'après le communiqué de janvier 2005 du Comité Français de l'Antibiogramme.

Standardisation De L'antibiogramme En Médecine Humaine, 3^{ème} édition, 2005, 83.

25. Anonyme 10, 2003

Logiciel WHONET version 5.3 (logiciel OMS), Décembre 2003.

<http://www.who.int/emc/WHONET/Instructions.html>

26. Arp L.H., 1985

Effect of antibodies to type 1 Fimbriae on clearance of fimbriated *Escherichia coli* from the blood stream of turkeys.

Am. J. Vet. Res., Vol 46, N° 12, December 1985, 2644-2647.

27. Arp L.H., 1982

Effect of passive immunization on phagocytosis of blood-borne *Escherichia coli* in spleen and liver of turkeys.

Am. J. Vet. Res, Vol 43, N° 6, 1982, 1034-1040.

28. Barbour E.K., Nabbut N.H. and Al-Nakhli H.M., 1985

Use of epidemiologique markers to identify the source of *Escherichia coli* infections in poultry.

Am J Vet Res, vol 46, N°4, 1985, 989-991.

29. Barnes H.J. and Gross W.B., 1997

Colibacillosis.

Diseases of Poultry, 10ème édition, 1997, 131-141.

30. Barry AL, Uchs PC and Brown SD, 2001

In vitro activities of threeronfluorinated quinolones against representative bacterial isolates.

Antimicrob. Agents Chemother.; 2001 ; 45 : 1923-1927.

31. Bensemmane A., Tber A et Zarrouk K, 1995

Flumisol, solution buvable.

Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires au Maghreb, 2^{ème} édition, 1995, 75-76.

32. Berche P., Gaillard J-L et Simonet M., 1989 (a)

Escherichia coli : caractères bactériologiques.

Bactériologie (Bactéries des Infections Humaines), Médecine-Sciences / Flammarion, 2^{ème} édition, 1989, 106- 110.

33. Berche P., Gaillard J-L et Simonet M., 1989 (b)

Structure, mode d'action des antibiotiques et mécanismes de la résistance bactérienne.

Bactériologie (Bactéries des Infections Humaines), Médecine-Sciences / Flammarion, 2^{ème} édition, 1989, 575-592.

34. Birge E.A., 1994

Chapter 12 : Other plasmids and other conjugaison systems.

Bacterial and bacteriophage genetics, 3rd édition, 1994, 318-326.

35. Bisgaard M., 1995

Salpingitis in web-footed bird: prevalence, Etiology and significance.

Avian Pathology, 1995, 24, 443- 452.

36. Blanco J.E., Blanco M., Mora A. and Blanco J., 1997
Production of toxins (Enterotoxins, Verotoxins, and Necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: Relationship with in vivo pathogenicity.
Journal of Clinical Microbiology, Nov. 1997, Vol 35, N° 11, 2953-2957.
37. Blanco J.E., Blanco M., Mora A. and Blanco G., 1997
Prévalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain.
Journal of Clinical Microbiology, Aug. 1997, Vol 35, N° 8, 2184-2185.
38. Blanco J., Blanco M., Alonso M.P., Blanco J.E., Gonzalez E.A., and Garabal J.I., 1992
Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (C.N.F.1).
Res. Microbiol., 1992, 143, 869-878.
39. Blanco J.E., Blanco M., Mora A., Jansen W.H., Garcia V., Vasquez M.L. and Blanco J., 1998
Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (North-west Spain).
Veterinary Microbiology, 1998, 61, 3, 229-235.
40. Boothe D.M., 1994
Enrofloxacin revisited.
Veterinary Medicine, August 1994, 744-753.
41. Bouzoubaa K., Mouahid M., El-Houadfi M., Amara A., Jaouzi T. et Bell J.G., 1989
Les dominantes pathologiques en aviculture au Maroc: Etude retrospective 1977-1987.
Maghreb Vétérinaire, Vol 4, N° 20, Décembre 1989, 15-19.
42. Bree A., Dho M. and Lafont J.P., 1989
Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *E. coli* strains with or without virulence factors.
Avian Diseases, 1989, 33, 134-139.

43. Brion J.D., Loppinet V. et Plat M., 1992
Chapitre 12: QUINOLONES.
Traité De Chimie Thérapeutique, Volume 2 (Médicaments antibiotiques), TEC & DOC,
Lavoisier, 1922, 439-489.
44. Brown S.A., 1996
Fluoroquinolones in animal health.
J. Vet. Pharmacol. Therap., 1996, 19, 1-14.
45. Bryskier A and Chantof J.T, 1995
Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones.
Drugs, 1995, 49, Suppl. 2, 16-28.
46. Capet R.G., 1970 (a)
Production d'Acétyl-Méthyl-Carbinol.
Aide-mémoire de détermination bactérienne, Vigot frères éditeurs, 1970, p. 62.
47. Capet R. G., 1970 (b)
Production d'Indole.
Aide-mémoire de détermination bactérienne, Vigot frères éditeurs, 1970, p. 65.
48. Caprioli A., Morabito S., Brugère H., and Oswald E., 2005
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission.
Vet. Res., 36, 2005, 289-311.
49. Carbon C, Regnier B, Saimot A.G., Vilde J.L. et Yeni P, 1994
Médicaments anti-infectieux.
Flammarion, Paris, 1994, 123-146.
50. Chabanon G., Hartley C.L., and Richmond M.H., 1982
In vitro attachment to human cell line of *Escherichia coli* strains causing urinary-tract infection:
Occurrence of Fimbriae (pili) in adhesive and non-adhesive strains.
Ann. Microbiol., 1982, 133, A, 357-369.

51. Clifford S., 1992
Quinolones.
Encyclopedia of Microbiology, volume 3, M-R, 1992, 489-496.
52. Cloud SS, Rosenberger J.K., Fries P.A., Wilson R.A. and Odor E.M., 1985
In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli* 1 serotypes, metabolic activity and antibiotic sensitivity.
Avian Diseases, 1985, 29, 1084-1093.
53. Cohen SP, McMurry LM and Levy SB, 1988
marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol.; 1988; 170 ; 5416-5422.
54. Courvalin P. et Philippon A., 1989
Chapitre 14: Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens.
Bactériologie Médicale, 2ème édition, Médecine-Sciences/Flammarion, 1989, 332- 355.
55. Courvalin P. et Trieu-Cuot P., 1989
Chapitre 13: Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques.
Bactériologie Médicale, 2ème édition, Médecine-Sciences/Flammarion, 1989, 316- 330.
56. Curtis M.J., Scott B.W. and Butler E.J., 1981
The influence of *Escherichia coli* O78 endotoxin on carbohydrate metabolism in the domestic fowl.
Research in Veterinary Science, 1981, 30, 57-61.
57. Dasgupta P., Chanda A., Sanatan B. and Bhui S., 1995
Drug sensitivity of *Escherichia coli* isolated from acian colibacillosis.
Indian Journal of Animan Health, 1995, 31, 2, 169-170.

58. Dominick M.A. and Jensen A.E., 1984
Colonization and persistence of *Escherichia coli* in axenic and monoxenic turkeys.
Am. J. Vet. Res, vol 45, N° 11, 1984, 2331-2335.
59. Drlica K and Zhao X, 1997
DNA-gyrase, Topoisomérase IV, and the 4-quinolones.
Microbiology and Molecular Biology Reviews; 1997; 377-392.
60. Eberlin T., 1997
Les bactéries pathogènes: Les bacilles Gram négatif aéro-anaérobies facultatifs.
Les infections microbiennes, tome 1, Agents infectieux, éditions Nathan, 1997, 9-13.
61. E.M.E.A., 1999
Antibiotic resistance in the european union associated with therapeutic use of veterinary medicines.
Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products.1999.
62. Entdz H.P., Ruijs G.J., Klinger B, Jansen W.H. and Reyden T, 1991
Quinolones resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 27, 1991, 199-208.
63. Euzeby J.P., 2004
Morphologie et structure des bactéries (procaryotes).
Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, 2004. (<http://anne.decoster.free.fr/bgn/struct.html>).
64. Euzeby J.P., 2005 (a)
Entérobacteriaceae « Entérobactériales ».
Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, 2005. (<http://anne.decoster.free.fr/bgn/enter.html>).
65. Euzeby J.P., 2005 (b)
Evaluation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.
Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, 2005. (<http://anne.decoster.free.fr/bgn/atbr.html>).

66. Fontaine M., 1988
Quinolones.
Vade-Mecum du Vétérinaire, 15^{ème} édition, 1988, 201-205.
67. Fontaine M. et Cadore J.-L., 1995 (a)
Chapitre IV. Médicaments et médications – I. Antibactériens – 4. Quinolones.
Vade-Mecum du Vétérinaire, 16^{ème} édition, VIGOT, 1995, 203-207.
68. Fontaine M. et Cadore J.-L., 1995 (b)
Chapitre XXIV. Pathologie des volailles – Colibacilloses Aviaires-Coligranulomatose.
Vade-Mecum du Vétérinaire, 16^{ème} édition, VIGOT, 1995, 1459-1460.
69. Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C., 2000
Les Entérobactéries.
Précis de bactériologie clinique, Editions ESKA, Paris, 2000, 1503-1592.
70. Fung D.Y.C., 1987
Chapter 2 : Types of microorganisms.
The Microbiology of Poultry Meat Products, Academic Press, Inc., 1987, 5-27.
71. Garau J., Xercavins M., Rodriguez-Carballeira M., Gomez-Vera J.R., Coll I., Vidal D., Llovet T. and Ruiz-Bremon A., 1999
Emergence and dissemination of quinolones-resistant *Escherichia coli* in the community.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov. 1999, 2736-2741.
72. George B.A. and Fagerberg D.J., 1984
Effect of bambarmycins, in vitro, on plasmid-mediated antimicrobial resistance.
Am. J. Vet. Res., Vol 45, N° 11, November 1984, 2336-2341.
73. Glunder G., 1990
Dermatitis in broilers caused by *Escherichia coli*.
Journal of Veterinary Medicine, 1990, 37, 383-391.

74. Gomis S.M., Riddell C., Potter A.A., and Allan B.J., 2001
Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulites and other colibacillosis lesions.
The Canadian Journal of Veterinary Research, 2001, 65, 1-6.
75. Gordon R.F., 1979
Infections à coliformes.
Pathologie des volailles, Maloine S.A. éditeur, 1979, 48-51.
76. Gross W.B., 1990
Factors affecting the development of respiratory disease complex in chickens.
Avian Diseases, 1990, 34, 607-610.
77. Guimaraes de Brito B., Gaziri L.C.J., and Vidotto M.C., 2003
Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulites.
Infection and Immunity, July 2003, Vol 71, N° 7, 4175-4177.
78. Haslay C. et Leclerc H., 1993
Micro-organisme de l'eau et infections d'origine hydrique.
Microbiologie des eaux d'alimentation, Technique et documentation-Lavoisier, 1993, 65-82.
79. Hee Kon Jung, 1999
Identification of serotype by use of serologic assay and detection of the enterotoxin gene of *Escherichia coli* by means of a polymerase chain reaction assay for isolates from pigs, chickens and cows.
AJVR, Vol 60, N° 4, 1999, 468-472.
80. Heller E.D., Leinter G., Darabken N. and Melamed D., 1990
Passive immunization of chicks against *Escherichia coli*.
Animal Pathology, 1990, 19, 345-354.

81. Hooper D.C., 1995
Quinolones : mode of action.
Drugs, 1995, 49, Suppl. 2, 10-15.
82. Hooper DC, 2001
Mechanisms of action of antimicrobials: Focus on fluoroquinolones.
Clinical Infectious Diseases; 2001; 32: 9-15.
83. Horton H.R., Moran L.A., Ochs R.S., Rawn J.D. et Scrimgeour K.G. ; 1994
Chapitre 1 : Introduction à la biochimie : *A. Escherichia coli* est le Procaryote-type.
Principes De Biochimie ; De Boeck Université ; 1994 ; 14-16.
84. Hoshino K, Kitamura A, Morrissey I, Sato K, Kato J and Ikeda H, 1994
Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomérase IV by quinolones with DNA-gyrase inhibition.
Antimicrob. Agents Chemother.; 1994 ; 38 (11) : 2623-2627.
85. Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg's E.A. , 1995
Chapter 10: Antimicrobial Chemotherapy.
Medical Microbiology, 20th edition, Alangemedical book, 1995, 163-164.
86. Johnson J.R., Murray A.C., Gajewsky A., Sullivan M., Snippes P., KusKowski M.A., and Smith K.E., 2003
Isolation and molecular characterization of nalidixic Acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, July 2003, Vol 47, N° 7, 2161-2168.
87. Joya J.E., Tsuji T., Jacaline A.V., Arita M., Tsukamoto T., Honda T. and Miwatani T., 1990
Demonstration of Enteropathogenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks.
European Journal of Epidemiology, 1990, 6, 88-90.

88. Khodursky AB, Zechiedrich EL and Cozzarelli NR, 1995
Topoisomérase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1995; 92: 11801-11805.
89. Koch A.L., 1995
Chapter 10: The Gram-Negative Rod: *Escherichia coli*.
Bacterial Growth and Form, Chapman & Hall, 1995, 250-305.
90. Lamarche M.G., Dozois C.M., Daigle F., Caza M., Curtis III R., Dubreuil J.D., and Harel J.,
2005
Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain.
Infection and Immunity, July 2005, Vol 73, N° 7, 4138-4145.
91. Laragione R.M., Cooley W.A. and Woodward M.J., 2000
The role of fimriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants.
J. Med. Microbiol., vol. 49, 2000, 327-338.
92. Lecoanet J., 1992
Colibacilloses Aviaires.
Manuel de Pathologie Aviaire, 1992, 237-240.
93. Lecoœur-Bitchatchi S. et Kolf-Clauw M., 1999
Les nouvelles quinolones en médecine vétérinaire.
Recueil de Médecine Vétérinaire, 1999, 175, 1/2, 7-15
94. Lecompte S, Baron MH et Chenon MT, 1998
Les fluoroquinolones et leurs cibles, interactions moléculaires aux grandes dilutions.
Lettre des sciences chimiques ; 1998-1999 ; 68 : 16-17.

95. Lesbouyries G., 1965
Affections De L'ombilic (Omphalite).
Pathologie des oiseaux de basse-cour, Vigot frères, éditeurs, 1965, 161-163.
96. Leminor L., Sansonetti Ph., Richard Cl., Grimont F., Mollaret H.H, Bercovier H. et Alonso J.M., 1989
Chapitre 17: Entérobactéries.
Bactériologie Médicale, 2ème édition, Médecine-Sciences/Flammarion, 1989, 389- 406.
97. Li G., Laturus C., Ewers C., and Wieler L.H., 2005
Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicaemia by signature-tagged mutagenesis.
Infection and Immunity, May 2005, Vol 73, N° 5, 2818-2827.
98. Lior H., 1994
Classification of *Escherichia coli*.
CAB International, United Kingdom, 1994, 31-72.
99. Luttinger A, 1995
The twisted life of DNA in the cell: bacterial topoisomérases.
Mol. Microbial.; 1995; 15: 601-606.
100. Magras C, Federighi M. et Pilet M.F., 1998
Escherichia coli vérotoxino-gènes.
Manuel de Bactériologie Alimentaire, Polytechnica, 1998, 81- 89.
101. Martinez-Martinez L, Pascual A and Jacoby G.A, 1998
Quinolone resistance from a transferable plasmid.
The Lancet, 1998, 51, 797-799.

102. Maur N., 1990 (a)

Deuxième Partie : Etude Analytique Des Familles D'antibiotiques – Les quinolones.

Vademecum Des Antibiotiques Et Agents Chimiothérapeutiques Anti-Infectieux, 5^{ème} Edition, Maloine, 1990, 685-700

103. Maur N., 1990 (b)

Deuxième Partie : Etude Analytique Des Familles D'antibiotiques – Les fluoroquinolones.

Vademecum Des Antibiotiques Et Agents Chimiothérapeutiques Anti-Infectieux, 5^{ème} Edition, Maloine, 1990, 701-732.

104. Maur N., 1990 (c)

Classification des antibiotiques.

Vade-Mecum Des Antibiotiques et Agents Chimiothérapeutiques Anti-Infectieux, 5^{ème} édition, Maloine, 1990, 13-44.

105. Meissonnier E., Devisme P et Join-Lambert P, 1995

Baytril 10% solution buvable.

Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des produits de Santé Animale, Editions du Point Vétérinaire, 1995, D67-D68.

106. Mellata M., Dho-Moulin M., Dozois C.M., Curtiss III R., Lehoux B. and Fairbrother J.M., 2003

Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophage.

Infection and Immunity, Jan. 2003, vol 71, N° 1, 494-503.

107. Mellata M., Jacquemin E., Bakour R. et Mainil J., 1998

Résistance aux antibiotiques de souches d'*Escherichia coli* bovines et aviaires isolées en Algérie.

Ann. Méd. Vét., 1998, 142, 129-138.

108. Merck, Sharp et Dohme, 1977

Infections à *Escherichia Coli* (Colibacillose).

Manuel d'aviculture, deuxième édition, 1977, 106-107.

Dr LEZZAR Nawel
Spécialiste en Aviculture et Pathologie Aviaire

109. Meunier D., Baucheron S, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E et Martel J-L., 2002
Mécanismes de résistance aux antibiotiques des salmonelles suivies à travers le RESSAB.
Bulletin des GTV, N°16, Juillet / Septembre 2002, 36-40.
110. Millemann Y., Mouline C., Lafont J-P. and Chaslus-Dancla E. ; 2005
Bacteraemia assays in chickens as a model for the evaluation of the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis strains;
Revue Méd. Vét., 2005, 156, 70-76.
111. Moalic P.Y. et Le Guennec J., 2000
Prévalence des facteurs de virulence de souches d'*Escherichia coli* responsables de diarrhées chez le porc en France.
Revue Méd. Vét., 2000, 151, 6, 523-526.
112. Mogenet L. and Fedida D, 1997
Antibiotherapy : general features.
Rational Antibiotherapy In Poultry Farming, Ceva Santé Animale, 1997, 27-71.
113. Mogenet L., Bezille P., Guyonnet J. et Karembe H., 1997
Comparaison de la fluméquine (Flumisol) à l'amoxicilline (Vetrimoxin poudre orale) dans deux modes d'administration par voie orale, en traitement de la colibacillose du poulet : approche pharmacodynamique et clinique.
Revue Méd. Vét., 1997, 148, 10, 793-804.
114. Mokady D., Gophna U., and Ron E.Z., 2005
Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains.
Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2005, Vol 43, N° 1, 66-73.
115. Moreau N., 1991
Mécanismes moléculaires de la bactéricidie : Quinolones.
Bactéricidie (Aspects Théoriques Et Thérapeutiques), édition Maloine, 1991, 35-47.

116. Moulin M. et Coquerel A., 2002
Chapitre 24 : Antibactériens synthétiques.
Pharmacologie, 2^{ème} édition, Masson, 2002, 239-246.
117. Nagi M.S. and Raggi L.G., 1992
Importance to air sac disease of water supplies contaminated with pathogenic *Escherichia coli*.
Avian Diseases, 1992, 16, 718-723.
118. Nakamura K., Osebe T. and Narita M., 1990
Dual infection of *Eimeria tenella* and *Escherichia coli* in chicks.
Research in Veterinary Science, 1990, 49, 125-126.
119. Nauciel C., 2000
Chapitre 21: *Escherichia coli*.
Bactériologie médicale, Masson, Paris, 2000, 127-131.
120. Naveh M.W., Zusman T., Sketulsky E. and Ron E.Z., 1984
Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect of pathogenicity.
Avian Diseases, 1984, 28, 651-661.
121. Nunoya T., Tajima M., Izuchi T., Takahashi K., Otaki T., Nagasawa Y. and Hakogi E.,
1991
Pathology of a broiler disease characterized by the swollen head.
Journal of Veterinary Medical Science, 1991, 53, 347-349.
122. O'brien, 1985
Swollen head syndrome.
The Veterinary Record, 1985, 117, 619-620.
123. Otaki Y., 1995
Poultry disease control programme in Japan.
Journal of Veterinary Medical Science, 1995, 20, 65-67.

124. Pattison M., Chettle N., Randall C.J. and Wyeth P.J., 1989
Observations of swollen head syndrome in broiler and breeder chickens.
The Veterinary Record, 1989, 125, 229-231.
125. Peighambari M., Vaillantcourt J.P., Wilson R.A. and Gyles C.L., 1993
Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis.
Proceeding of the 74th conference of research workers in animal diseases, 1993.
126. Pelmon J., 1995 (a)
Chapitre 12 : Croissance et mutations.
Bactéries et Environnement : Adaptations physiologiques, Volume I, Office Des Publications
Universitaires, 1995, 271-295.
127. Pelmon J., 1995 (b)
Chapitre 29 : Les bactéries et les métaux.
Bactéries et Environnement : Adaptations physiologiques, Volume II, Office Des Publications
Universitaires, 1995, 757-794.
128. Pelmon J., 1993 (c)
Chapitre 6 : Des protéines à l'ADN.
Enzymes, Office Des Publications Universitaires, 1993, 95-109
129. Pilet Ch., Bourdon J-L., Toma B., Marchal N. et Balbastre C., 1979
Généralités sur les entérobactéries.
Bactériologie médicale et vétérinaire (systématique bactérienne), 2^{ème} édition, Doin éditeurs,
1979, 109-150.
130. Prescott J.F. and Baggot J.D, 1993
Antimicrobial therapy in veterinary medicine.
Iowa State University Press, 1993, 252-262.

131. Puyt J.D., 1992

Les antibiotiques et antimicrobiens de synthèse.

Service de Pharmacie et de Toxicologie de l'ENV de Nantes, 1992, 157-167.

132. Ryter A., 1989

Chapitre 1 : Structure et anatomie fonctionnelle

Bactériologie Médicale, 2ème édition, Médecine-Sciences/Flammarion, 1989, 3- 22.

133. Rifaat k.M., 2001

Poultry medications and common mistakes;

Poultry Middle East and North Africa, 23rd year Nbr. 156, Jan.-Feb. 2001, 34-35.

134. Sandor R. Valentini, Tania A.T. Gomez, Deise P. and Falcao, 1992

Lack of virulence factors in *Escherichia coli* strains of enteropathogenic serogroups isolated from water.

Applied and Environmental Microbiology, Jan. 1992, 412-414.

135. Sebald M. et Petit J-C., 1997

Numérations.

Methodes De Laboratoire : Bactéries Anaérobies Et Leur Identification, 2^{ème} édition, 1997, Commission Des Laboratoires De Référence Et D'Expertise De L'Institut Pasteur, 45.

136. Sekizaki T., Akashi H., and Terakado N., 1985

Nucléotide sequences of the genes for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I of bovine, avian and porcine origins.

Am. J. Vet. Res., Vol 46, N° 4, April 1985, 909-912.

137. Simon M. S., 2001

Part 2: Significant *E. coli* related conditions of poultry.

World Poultry-Elsevier, Volume 17, N°10, 2001, 35-37.

138. Singleton P., 1994 (a)
Chapitre 14 : Un peu de bactériologie pratique.
Bactériologie, 2^{ème} édition, Masson, 1994, 173-191.
139. Singleton P., 1994 (b)
Chapitre 16 : L'identification et la classification des bactéries.
Bactériologie, 2^{ème} édition, Masson, 1994, 204-218.
140. Spicer W.J., 1992
Microbes: Principes généraux.
Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie, Médecine-Sciences / Flammarion,
1992, 2-5.
141. Stipkovits L.; 1988
Studies on the Efficacy of Baytril in Chicks after Experimental Infection with *Mycoplasma gallisepticum* and *E. coli*.
Vet. Med. Rev. 59, 1988, 103-107.
142. Stordeur P. et Mainil J., 2001
La colibacillose aviaire.
Ann. Méd. Vét., 2001, 146, 11-18.
143. Szalo I.M., Goffaux F., Pirson V., Piérard D., Ball H., and Mainil J., 2002
Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli*
of genes encoding for putative adhesions of human EHEC strains.
Research in Microbiology, 153, 2002, 653-658.
144. The Merk Veterinary Manual, 1991
Merk and co., Inc., USA, 1991, 1457-1460.
145. Tillotson G.S., Dorrian I and Blondeau J, 1997
Fluoroquinolone resistance: mechanisms and epidemiology.
The Journal of Medical Microbiology, 1997, 46 (6), 457-470.

146. Tivendale K.A., Allen J.L., Ginus C.A., Crabb B.S., and Browning G.F., 2004
Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*.
Infection and Immunity, Nov. 2004, Vol 72, N° 11, 6554-6560.
147. Turqi S, 2000
Protectotyping of avian Infectious Bronchitis Virus-Importance and applications.
Poultry Middle East and North Africa; 22d Year Nbr. 155 / Nov. - Dec. 2000; 11 - 13.
148. Vaillancourt J.P., Elfadil A. and Bissailon J.R., 1992
Cellulitis in poultry.
Canada Poultry Diseases, 79, 1992, 34-37.
149. Van den Bogaard A.E., London N., Driessen C. and Stobberingh E.E., 2001
Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 47, 763-771.
150. Vernozy-Rozand C. et Ray-Gueniot S., 1997
Escherichia coli O157:H7 : Etude clinique, pathogénique, épidémiologique et prévention des accidents alimentaires.
Revue Méd. Vét., 1997, 148, 2, 89-98.
151. Villate D., 2001 (a)
Notions de bactériologie et de virologie.
Maladies des volailles, Editions France Agricole, 2^{ème} édition, 2001, 142-147.
152. Villate D., 2001 (b)
Les Infections A *Escherichia Coli*.
Maladie des volailles, Editions France Agricole, 2^{ème} édition, 2001, 236 -243.

153. Webber M. and Piddock L.J.V., 2001

Quinolone resistance in *Escherichia coli*.

Vet. Res. 32, 2001, 275-284.

154. Wooley R.E, Spears K.R., Brown J., Nolan L.K. and Fletcher O.J., 1992

Relationship of compliment resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*.

Avian Deseases, 36, 1992, 679-684.

155. Wray C. and Woodward M.j., 1994

Laboratory diagnosis of *Escherichia coli* infections.

CAB International, United Kingdom, 1994, 595-628.

156. Yogaratnam V., 1995

Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant.

The Veterinary record, 1995, 137, 215-217.

157. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M and Nakamura S, 1990

Quinolones resistance-determining region in the DNA-gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*.

Antimicrob. Agents Chemother.;1990 ; 34 : 1271-1272.

RESUME

Deux molécules de quinolones (la fluméquine et l'enrofloxacin) ont été administrées par voie orale selon deux modes d'abreuvements (sur 03 heures et sur 24 heures) en traitement d'une colibacillose aviaire expérimentale après inoculation d'une souche très pathogène d'*Escherichia coli* (O78:K80) sur des poulets de chair.

L'émergence d'une antibiorésistance, juste après l'introduction de ces deux molécules, sur les souches d'*Escherichia coli* prélevées de la flore fécale des sujets traités sur 24 heures d'abreuvement, a permis de mettre en évidence l'influence de ce traitement oral sur cette résistance aux quinolones.

En plus du mode d'administration, d'autres éléments, tels que la molécule d'antibiotique, la souche bactérienne et la souche animale, semblent être associés à cette antibiorésistance et laissent supposer l'intervention de ces derniers en tant que facteurs influençant sur les niveaux de résistance.

L'émergence de résistance aux quinolones chez toutes les espèces bactériennes a été reconnue après l'introduction de ces molécules en thérapeutique, et rapportée par plusieurs études effectuées sur cette famille d'antibiotiques ; c'est pourquoi, une surveillance de l'antibiorésistance s'impose.

MOTS-CLES:

Traitement oral - Fluméquine - Quinolones - *Escherichia coli* - Antibiorésistance - Flore fécale - Poulet de chair.

SUMMARY

Two molecules of quinolones (flumequine and enrofloxacin) were administered by oral form according to two modes of watering (on a 3 hours and 24 hours period of time) in treatment of experimental poultry colibacillosis after inoculation of the most pathogenic strain of *Escherichia coli* (O78:K80) at broiler chickens.

The emergence of antibiotic resistance, just after oral administration on a 24 hours period of watering of flumequine and Enrofloxacin, allowed be setting obviously the influence of oral treatment on this quinolones resistance.

In addition of administration mode, an other elements, like antibiotic's molecules, bacterial strain, and animal species, seem to be associated to this antibiotic resistance and let suppose their intervention later, in so far as factors influencing on level's resistance.

The emergence of quinolone's resistance on all bacterial species, were recognized after introduction of these molecules in therapy and were reported by many studies carried on this family of antibiotic, and so, an antibiotic resistance surveillance are imperative.

KEY-WORDS:

Oral treatment – Flumequine – Quinolones – *Escherichia coli* – Antibiotic resistance – Faecal flora – Broiler chickens.

المخلص

جزيئتان من الكينولين (الفلوموكوين و الانروفلوكساسين) أعطيتا عبر الفم بطريقتين (لمدة 3 ساعات و 24 ساعة في اليوم) و ذلك لعلاج مرض العصيات القولونية التي تم تلقيحها تجريبيا بواسطة العترة البكتيرية O78:K80 عند دجاج اللحم.

ظهرت المقاومة للمضادات الحيوية للعصيات القولونية الصادرة من الفلورا البرازية عند الطيور التي تم علاجها طوال 24 ساعة في اليوم، و ذلك اثر إدخال العلاج، بين تأثير نوع العلاج (عن طريق الفم) على ظهور هذه المقاومة ضد الكينولين.

إلى جانب طريق منح العلاج، فان عوامل أخرى، مثل: جزيئة المضاد الحيوي، العترة البكتيرية و العترة الحيوانية، قد تكون لها علاقة بالمقاومة للمضادات الحيوية باعتبارها كعوامل مؤثرة على درجة المقاومة للمضادات الحيوية.

ظهرت المقاومة ضد الكينولين على البكتيريا، بعد استعمالها كوسيلة علاج، ظاهرة معروفة من خلال كل الدراسات التي أجريت عليها؛ و لهذا فان تشديد الحراسة على المقاومة للمضادات الحيوية أمر جد ضروري.

الكلمات المفتاح

العلاج عن طريق الفم - الفلوموكوين - الكينولين - ميكروب/أي كولاي - المقاومة للمضادات الحيوية - الفلورا البرازية - دجاج اللحم.