

UNIVERSITE DE TLEMCCEN
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

Magister en Ecologie Animale

Option: Microbiologie

Présentée par

Mohrad **DRISSI**

Thème

**Etude des Colibacilles de la Microflore Fécale
du veau nouveau-né dans une ferme d'élevage
de la Wilaya de Tlemcen**

Soutenue le 1996, devant le jury:

Président	:	M ^{elle} FORTAS Z.
Promoteur	:	M ^r CHIKHI A.
Examinateurs	:	M ^r BAKOUR R. M ^r BOUSSEBOUA H. M ^{elle} BENHASSINE T.
Dobité d'honneur	:	M ^r BOUDILMI A.

DEDICACES

A mes chers parents

A ma femme

A mes enfants MESDJ et FARAS

A mes frères et soeurs

A toute ma famille

A ma belle famille

A tous mes amis

A tous mes collègues

A tous ceux que j'aime

qu'ils trouvent ici,

l'expression de ma profonde affection.

REMERCIEMENTS

- J'exprime ma profonde reconnaissance à M^r CHIKHI Ali, Professeur à l'I.S.N. de Bab Ezzouar, pour avoir accepté un surcroît de travail en étant le promoteur de cette thèse et pour ses nombreux conseils avisés lors de l'élaboration de ce mémoire.

Puisse t-il trouver ici un témoignage de ma respectueuse gratitude.

- J'adresse à M^{lle} FORTAS Z., Maître de Conférence à l'Université d'Oran, mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de ma thèse.

- J'exprime ma profonde sympathie à M^r BAKOUR R., Maître de Conférence à l'I.S.N. de Bab Ezzouar. Je le remercie vivement de m'avoir consacré une partie de son temps précieux, pour son accueil toujours sympathique et pour l'amitié qu'il me témoigne en acceptant de participer au jury de cette thèse.

- Mes vifs remerciements vont aussi à M^r BOUSBOUA H., Maître de Conférence à l'Université de Constantine, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

- Je témoigne ma grande reconnaissance à M^{lle} BENHASSINE T. de L'Institut Pasteur d'Alger, pour sa grande contribution à la réalisation des techniques d'électrophorèse sur gel d'agarose.

Pour son accueil, et pour avoir accepté de juger ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde sympathie.

- Mes plus sincères remerciements s'adressent également à tous ceux qui de loin ou de près ont participé à la réalisation de ce travail en particulier:

- L'équipe du laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Institut Pasteur d'Alger.
- M^r CONTREPOIS M. et toute l'équipe du laboratoire de l'INRA de Theix à Clermont ferrand en particulier M^r CHERIFI A..
- M^r HASSANI A. du laboratoire de Microbiologie de l'I.S.N. de Tlemcen.

- Enfin j'adresse mes plus vifs remerciements à M^r SMAHI D. pour l'élaboration de ce document.

S O M M A I R E

LISTE DES TABLEAUX	1
A. INTRODUCTION	2
B. GENERALITES	4
I. CARACTERES GENERAUX ET CLASSIFICATION DES ENTEROBACTERIACEAE: NOTION DE COLIFORMES.....	4
II. LE VEAU NOUVEAU-NE: NOTION DE PERIODE NEONATALE.....	6
III. ORIGINE DES ENTEROBACTERIES DU TUBE DIGESTIF DU NOUVEAU- NE.	6
IV. IMPLANTATION DE LA FLORE DIGESTIVE DU VEAU NOUVEAU-NE.	7
1. Evolution dans le temps.	8
2. Répartition de la microflore chez les polygastriques dans les différents compartiments du tube digestif.....	8
3. Mécanismes influençant l'implantation de la flore intestinale.....	9
a. Mécanismes liés à l'hôte.....	9
a.1. Les constituants chimiques.....	9
a.2. Le mucus.....	10
a.3. La motricité intestinale.....	10
a.4. Les mécanismes immunitaires.....	10
b. Mécanismes liés à l'environnement.....	11
b.1. Les aliments.....	11
b.2. Les antibiotiques.....	11
V. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	12
1. Définition de l'antibiorésistance.....	12
2. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques.....	13
a. Au niveau du chromosome bactérien.....	13
b. Au niveau de plasmides ou transposons.....	13
b.1 Les plasmides conjugatifs ou autotransmissibles.....	15
b.2 Les plasmides non conjugatifs.....	15
3. Evolution de l'antibiorésistance.....	17
VI. LES PATHOLOGIES COLIBACILLAIRES.....	18
1. Les hémolysines.....	18
a. Présentation.....	18
b. Déterminisme génétique.....	19

c. Association avec la pathologie.....	19
d. Role de l'hémolysine dans la virulence des souches productrices.	20
2. Les colicines.....	20
C. ETUDE EXPERIMENTALE.....	22
I. PRELEVEMENT	22
1. Matériel utilisé.....	22
2. Nature et lieu des prélèvements	22
3. Technique de prélèvement.....	22
4. Acheminement.....	26
II. DENOMBREMENT.....	26
1. Matériel et milieux utilisés	26
2. Technique.....	26
3. Lecture	26
4. Résultats et discussion.....	27
III. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION	30
1. Milieux utilisés et réactifs	30
2. Méthodes.....	31
a. Réisolement et sélection des souches à identifier	31
b. Test biochimiques.....	32
b1. Test des 3 sucres (TSI)	32
b2. Recherche de la production d'Indole.....	32
b3. Recherche des produits de fermentation du glucose.....	32
b4. Test au citrate de Simmons	33
b5. Recherche de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH).....	33
b6. Recherche de l'uréase et de la tryptophane désaminase.....	33
b7. Test Mannitol-mobilité.....	34
b8. Hydrolyse de la gélatine	34
b9. Test d'utilisation des différents sucres	34
3. Résultats et discussion.....	37
a. Nombre de coliformes identifiés.....	37
b. Répartition des colibacilles en fonction du type biochimique.....	37
b.1. Une catégorie englobant les chimiotypes dominants représentés sur le Tableau 9	41
b2. Une deuxième catégorie comprenant 6 chimiotypes dont les proportions se situent entre 1 et 5%	43
b3. Dans la 3 ^e catégorie, il y a lieu de placer les types biochimiques rares dont les proportions sont inférieurs à 1%.	43
c. En fonction des veaux et de leur état physiologique	44

IV. RECHERCHE DE DEUX FACTEURS IMPLIQUES DANS LA VIRULENCE: HEMOLYSINE ET COLICINE.....	47
1. Hemolysine.....	47
a. Principe.....	47
b. Matériel et méthode.....	48
c. Résultats et discussion.....	48
2. Colicines.....	48
a. Matériel.....	48
b. Méthode.....	49
c. Résultats et discussion.....	49
V. ETUDE DE L'ANTIBIORESISTANCE.....	52
1. Matériel et méthodes.....	52
a. Matériel.....	52
a.1. Matériel biologique.....	52
a.2. Les antibiotiques.....	52
a.3. Milieux et réactifs utilisés.....	53
b. Méthodes.....	53
b.1. Antibiogramme.....	53
b.2. Réalisation de la conjugaison.....	54
b.3. Caractérisation des plasmides par électrophorèse.....	57
2. Résultats et discussion.....	58
a. Antibiorésistance globale.....	58
b. Résistance vis à vis des antibiotiques testés.....	58
c. Multirésistance - Les antibiotypes.....	64
c.1. Multirésistance.....	64
c.2. Evolution de l'antibiorésistance - Répartition des antibiotypes dans le temps.....	67
c.3. Aspect biochimique et antibiorésistance.....	69
d. Résultats et discussion.....	72
e. Résultats de la caractérisation des plasmides.....	74
CONCLUSION GENERALE.....	80
BIBLIOGRAPHIE.....	82
RESUME.....	97

ETUDE DES COLIBACILLES
DE LA MICROFLORE FECALE
DU VEAU NOUVEAU-NE
DANS UNE FERME D'ELEVAGE
DE LA WILAYA DE TLEMCCEN

LISTE DES TABLEAUX

1. Classification des Enterobacteriaceae sur la base de caractères biochimiques.
2. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques.
3. Antibiotiques vis à vis desquels aucune résistance plasmidique n'a été décelée.
- 4a. Prélèvements chez les veaux et leurs caractéristiques.
- 4b. Caractéristiques du lait en poudre utilisé dans l'alimentation du veau.
5. Numération bactérienne en fonction de l'âge (fig. 1).
6. Récapitulatif des tests d'identification.
7. Corrélation entre les différents types de colibacilles et les caractéristiques biochimiques.
8. Comportement des colibacilles vis à vis des épreuves utilisées.
9. Position des différents chimiotypes en fonction de divers travaux.
10. Répartition des chimiotypes en fonction des veaux et de leur âge.
11. Production de colicines en fonction des veaux.
12. Antibiotypes des colibacilles de tous les veaux nouveau-nés.
13. Comportement des colibacilles vis à vis de chaque antibiotique (Fig. 2)
14. Répartition de l'antibiorésistance chez tous les colibacilles (Fig. 3).
15. Résistance à un ou plusieurs antibiotiques pour chacun des veaux en fonction de leur âge.
16. Antibiotypes des colibacilles dominants.
17. Détermination des caractères transférés.
18. Caractérisation des plasmides.

I N T R O D U C T I O N

A. INTRODUCTION

Dans ce travail, nous nous proposons d'étudier le groupe des coliformes dans la microflore fécale du veau nouveau-né, dans une ferme d'élevage de la région de Tlemcen. Parmi les nombreuses études réalisées de par le monde, nous avons jugé utile d'effectuer ce travail dans la mesure où il n'a pas encore été réalisé en Algérie. Précisons que depuis les recherches de pionniers tel Tissier en 1905, l'inventaire des bactéries intestinales a progressé considérablement mais est loin d'être achevé. Il y a lieu de signaler qu'en plus de l'intérêt fondamental de connaissance du groupe dans son installation, son évolution chez le veau nouveau-né, il y a l'aspect infectieux de l'espèce *Escherichia coli*, incriminée dans la colibacillose et la septicémie du jeune animal, dont l'impact n'a pas encore été évalué avec précision dans notre pays. Ces études ont débouché en Europe, d'une part, à une bonne connaissance des souches impliquées dans chaque région et à l'évaluation des pertes économiques dues à ces affections, et d'autre part à la mise au point de méthodes de lutte efficace par l'élaboration d'autovaccins à partir de souches sélectionnées localement (Chikhi, 1978), ou de vaccins types à partir de souches cataloguées comme fréquentes.

Nous devons signaler aussi que ce travail fut entamé parallèlement à un autre, concernant l'installation du même groupe de microorganismes chez le nouveau-né humain pour pouvoir faire une comparaison aussi bien dans les conditions d'installation des souches, des types de souches dominants et de leur évolution dans le temps, en fonction des conditions physiologiques.

Le suivi, concernera également l'antibiorésistance pour savoir si les phénotypes rencontrés au niveau d'une même région sont les mêmes.

Ce travail constitue une contribution dans l'étude de la microflore du tube digestif même si les travaux ailleurs sont nombreux et variés. Dans ce but, nous essaierons:

1. de déterminer le moment de l'apparition de cette microflore à la naissance et son évolution quantitative et qualitative dans le temps jusqu'à la sixième semaine.
2. de rechercher les souches dominantes dans le temps en fonction de l'âge et des conditions de l'animal.
3. de savoir si les veaux ont des types particuliers de colibacilles, par rapport à l'humain notamment en recherchant certains facteurs tels que les hémolysines et les colicines, en particulier la présence de colicines V réputées être un facteur de virulence.
4. nous étudierons enfin l'antibiorésistance des souches pour des raisons épidémiologiques et tenterons de savoir par des expériences de conjugaison et d'isolement des plasmides si le support est plasmidique. Le sérotypage des souches ne sera pas entrepris en raison de la grande variété des sérogroupes de colibacilles rencontrés chez les bovins et la nécessité de disposer de sérums correspondants.

GENERALITES

B. GENERALITES

I. CARACTERES GENERAUX ET CLASSIFICATION DES ENTEROBACTERIACEAE: NOTION DE COLIFORMES.

La famille des Entérobactériaceae regroupe des bacilles à Gram négatif de 2 à 3 μm de long et 0.6 μm de diamètre, non sporulés, présentant une ciliature pérित्रиче lorsqu'ils sont mobiles, aérobies anaérobies facultatifs, cultivant sur les milieux ordinaires à base d'extraits de viande, fermentant le glucose, réduisant les nitrates en nitrites généralement, possédant une catalase mais donnant toujours une réaction négative de l'oxydase. Le nom donné à cette famille fait allusion aux liens étroits que beaucoup de ses membres ont avec le tube digestif de l'homme et des vertébrés supérieurs. Mais cette localisation n'est pas exclusive, on peut isoler les Entérobactéries du sol et de l'environnement pollué par des excréments. Les végétaux représentent le gîte habituel de certaines espèces qui peuvent parfois devenir phytopathogènes. Ainsi les genres *Erwinia* ou *Enterobacter* peuvent être à l'origine de pathologies végétales telles que le "feu bactérien" des Rosaceae. De ce fait, la protection des végétaux peut faire appel aux antibiotiques, comme cela est pratiqué en médecine humaine et vétérinaire (Martel, 1986).

Dans la 9^{ième} édition de BERGEY en 1984, les Entérobactériaceae sont représentés par 20 genres, 14 genres étant reconnus et 6 autres genres nouvellement admis dans la famille, tel que le tableau n°1 le résume.

Parmi les Entérobactéries, selon BREED et NORTON in CHIKHI (1978), le groupe des coliformes s'individualise par sa capacité de fermenter le lactose à 30 °C, avec production de gaz, en moins de 48 heures. Les principaux genres du groupe peuvent être d'origine fécale ou non. Ce sont essentiellement les genres *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Klebsiella*.

**Tableau n° 1. Classification des Entérobactériacal
sur la base de caractères biochimiques.
D'après BERGEY'S MANUAL, 9^{ième} édition (1984).**

GENRES	ESPECES
Escherichia	- Escherichia coli - Escherichia adecarboxylata - Escherichia blattae - Escherichia coli inactive
Shigella	- 4 espèces
Salmonella	- 9 espèces
Citrobacter	- Citrobacter amalonaticus - Citrobacter diversus - citobacter freundii
Klebsiella	- Klebsiella oxytoca - Klebsiella p. subsp. ozaenae - Klebsiella p. subsp. rhinoscleromatis - Klebsiella p. subsp. pneumoniae
Enterobacter	- Enterobacter aerogenes - Enterobacter agglomerans - Enterobacter cloacae - Enterobacter gergoviae - Enterobacter intermedium - Enterobacter sakazakii
Serratia	- 7 espèces
Hafnia	- 1 espèce
Edwardsiella	- 4 espèces
Proteus	- 3 espèces
Providencia	- 3 espèces
Morganella	- 1 espèce
Yersinia	- 7 espèces
6 genres à affiliation incertaine	

II. LE VEAU NOUVEAU-NE: NOTION DE PERIODE NEONATALE.

La naissance est un phénomène relativement court pendant lequel le jeune mammifère passe par le col utérin de la mère. Au cours de cette expulsion, la relation entre la mère et le foetus est interrompue du fait de la compression du cordon ombilical: les fonctions vitales essentielles qui étaient assurées par la mère doivent être instantanément assumées par le jeune. Le veau nouveau-né présente à cet égard un degré de maturité assez élevé pour s'adapter à son nouveau milieu extra-utérin (MARTEL, 1986).

III. ORIGINE DES ENTEROBACTERIES DU TUBE DIGESTIF DU NOUVEAU- NE.

Parmi les Entérobactéries, *E. coli* est sans conteste, le microorganisme qui a suscité le plus de recherches dans ce domaine, probablement en raison de sa large répartition chez de nombreux animaux nouveau-nés, mais aussi du fait du caractère pathogène de certaines souches, et de sa culture facile (KORHONEN et coll., 1985; CONTREPOIS, 1988; CERF, 1989.)

La plupart des *E. coli* entéropathogènes rencontrés chez le veau, sont fréquemment multirésistantes aux principales familles d'antibiotiques, (MARTEL et coll., 1981; GUILLOT et LAFONT, 1983), d'où l'intérêt d'utiliser cette antibiorésistance comme marqueur pour analyser la relation mère-veau (BRUNEL, 1991).

Dans les conditions normales de naissance, au cours des premières 24 à 48 heures de vie, le veau posséderait une forte population de colibacilles antibiorésistants. Le plus souvent, les spectres observés sont variés et rappellent ceux rencontrés dans les fèces de la mère; les naissances gémellaires confortent également ces observations. En revanche lors de la naissance par césarienne, on observe généralement un retard dans l'implantation d'*E. coli* de 24 à 48 heures (GUILLOT et coll., 1987).

Afin d'évaluer la transmission de souches entéropathogènes mère-veau, des vaches gestantes ont été inoculées per os avec la même souche d'E. Coli K99⁺ Nal selon trois modalités différentes: 16 jours, 26 heures et 4 heures avant le vêlage. Dans la plupart des cas, les colibacilles entéropathogènes ont été retrouvés en position dominante dans les fèces des veaux de nouveau-nés (MOULIN et coll., 1984). L'utilisation de l'antibiorésistance, comme marqueur épidémiologique a aussi permis de préciser, comme chez l'enfant, la place prépondérante de la transmission mère-veau dans la colonisation du veau nouveau-né par le E. Coli. Cependant, les auteurs soulignent également, là aussi, l'importance de l'environnement, en particulier le niveau hygiénique de l'exploitation (pérennité des souches pathogènes), et de la transmission d'animal à animal, aussi bien de vache à vache que de veau à veau (GUILLOT et coll., 1987).

IV. IMPLANTATION DE LA FLORE DIGESTIVE DU VEAU NOUVEAU-NE.

Comme la plupart des animaux, le veau naît normalement axénique, c'est à dire, n'hébergeant aucune bactérie, excepté lors d'infections de la mère. Cette situation est très éphémère, car il entre en contact avec diverses flores dès la rupture des membranes foetales: microflore du vagin puis des fèces de la mère (MOULIN et coll., 1984).

Dans l'écosystème endogène constitué par l'animal et la microflore qui s'implante très rapidement, s'établit un équilibre aux composantes nombreuses.

Le rôle des bactéries du tube digestif peut être:

- favorable à l'hôte:

- influence sur l'anatomie du tube digestif
- intervention dans la physiologie digestive
- rôle protecteur par l'"effet de barrière"

- défavorable:

- en détournant des facteurs essentiels à l'hôte
- en produisant des toxines ou des métabolites qui peuvent altérer la muqueuse intestinale et perturber son fonctionnement.

1. Evolution dans le temps.

Dans le tube digestif, stérile et dépourvu de toute immunité à la naissance, le développement des Entérobactéries commence très rapidement et atteint dès le premier jour sa valeur maximale. Les numérations bactériennes effectuées dans les fèces de veaux de 24 heures révèlent régulièrement des taux de 10^8 à 10^9 bactéries par gramme (CONTREPOIS et GOUET, 1973; 1977). Cependant les souches qui s'établissent les premières, ne persistent pas forcément en position dominante dans la microflore. On assiste pendant les premiers jours de vie de l'animal à de profonds remaniements. Des associations bactériennes séquentielles s'établissent: les germes aero-anaérobies (*E. coli*) et les anaérobies aérotolérants (streptocoques) s'implantent en premier lieu. Leur métabolisme entraîne un abaissement du potentiel d'oxydoréduction (rH) favorable à l'implantation secondaire de bactéries anaérobies strictes: *Clostridium*, *Bactéroïdes*, *Bifidobactérium* et *Fusobactérium* principalement chez le veau (CONTREPOIS et GOUET, 1977; GOUET et coll., 1980).

Absentes, ou à niveau faible jusqu'à l'iléon, ces bactéries anaérobies strictes atteignent 10^9 à 10^{10} par gramme dans le colon à partir du deuxième jour de la vie.

2. Répartition de la microflore chez les polygastriques dans les différents compartiments du tube digestif.

Les observations recueillies tendent à montrer que la place n'est pas définitivement réservée aux premiers occupants mais plutôt à ceux qui seraient le mieux adaptés au milieu dans lequel ils se trouvent.

L'implantation ne se ferait pas au hasard mais résulterait d'une étroite adaptation des micro-organismes aux divers biotopes constitués dans les différents segments du tube digestif représentant autant de niches écologiques différentes.

Chez le veau sain, *Lactobacillus acidobacillus* et *Lactobacillus fermenti* s'implantent dans la caillette à environ 10^5 à 10^6 bactéries/gramme de contenu stomacal, et dans le jéjunum. Dans ce dernier ils dominent nettement les streptocoques qui sont présents à 10^4 bactéries/gramme environ. Au delà de ce segment, probablement en raison de l'augmentation du pH, les Streptocoques atteignent des niveaux comparables à ceux de Lactobacilles. Les colibacilles sont souvent inhibés par les pH trop acides et sont généralement absents dans la caillette, le duodénum et le jéjunum où il ne dépassent pas quelques milliers par gramme quand ils s'y trouvent. Ils apparaissent nettement à partir de l'iléon à un niveau de 10^7 à 10^8 bactéries/gramme. C'est dans le caecum et le colon qu'ils atteignent le niveau le plus élevé 10^9 bactéries/gramme et parfois plus dès le premier jour de la vie du veau (GOUET et coll., 1980).

3. Mécanismes influençant l'implantation de la flore intestinale

a. Mécanismes liés à l'hôte

L'hôte agit sur la microflore qu'il héberge grâce à un certain nombre de mécanismes tels que les rapportent CONTREPOIS et GOUET en 1977:

a.1. Les constituants chimiques.

Divers constituants chimiques exercent certainement une influence mais les difficultés de manipulation des animaux axéniques expliquent que les connaissances restent limitées dans ce domaine. Ainsi, les sels biliaires, dont le rôle inhibiteur, voire lytique, est bien

connu in vitro peuvent avoir des effets sélectifs qui restent obscurs encore dans l'intestin grêle.

a.2. Le mucus.

Le mucus, qui semble jouer normalement un rôle de barrière et de véhicule assurant, en association avec la motricité intestinale, le nettoyage de l'intestin grêle peut être également le siège d'une flore spécifique dans certaines zones, voire être envahi par certaines bactéries pathogènes.

a.3. La motricité intestinale.

La motricité intestinale contribue largement à la distribution des bactéries dans le tube digestif. Le péristaltisme très actif des portions antérieures de l'intestin grêle assure un balayage de la microflore qui demeure peu abondante dans les conditions physiologiques normales jusqu'au caecum. Vers la valvule iléo-caecale, la stase se traduit par une augmentation considérable de la flore. Le colostrum interviendrait à ce niveau grâce à ses propriétés laxatives selon DARDILLAT et coll., 1977.

a.4. Les mécanismes immunitaires.

Absent dans l'estomac, un système immunitaire local très développé surtout par les IGA existe du pylore à l'anus. Chez le nouveau-né le système est immunologiquement compétent, mais n'ayant pas été normalement soumis aux stimulations par les antigènes bactériens, il ne peut jouer un rôle immédiat lors de la première colonisation du tube digestif. On conçoit l'importance à ce moment là, de l'apport d'une immunité passive d'origine colostrale à action locale immédiate pour le contrôle de l'implantation de la flore.

b. Mécanismes liés à l'environnement

L'environnement au sens large constitue la source des microorganismes qui vont coloniser le tube digestif. Le respect très strict des règles d'hygiène au moment du vêlage et dans les jours qui suivent doit permettre de maîtriser la nature et la quantité des microorganismes que le veau ingère à l'occasion du léchage de sa mère et des objets qui l'entourent, lors de la respiration et surtout de la prise des aliments.

b.1. Les aliments.

La nature de l'aliment joue vraisemblablement un rôle très important comme cela a été observé chez le nourrisson. L'allaitement maternel provoque l'apparition d'une flore anaérobie stricte alors que l'allaitement artificiel laisserait apparaître surtout des lactobacilles et des streptocoques selon GUILLOT et LAFONT (1983).

b.2. Les antibiotiques.

L'effet des antibiotiques utilisés soit comme suppléments soit en thérapeutique est évidemment très important et la tendance assez générale des bactéries à résister aux antibactériens est un phénomène complexe qui n'a cessé d'évoluer depuis que l'on utilise ces substances. GUILLOT et coll. (1983) distinguent la pression de sélection globale correspondant à l'utilisation des antibiotiques au niveau d'un pays et d'un type de production, et la pression plus spécifique liée à une pathologie et exercée par la prophylaxie ou la thérapeutique. Cette pression de sélection s'exerce sur la flore antibiorésistante dans l'élevage que les veaux acquièrent dans les heures qui suivent la naissance (ESCOULA et coll., 1984).

V. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Avec la découverte des antibiotiques, les méthodes de lutte contre les maladies infectieuses ont nettement évolué. Les antibiotiques ont ainsi fortement contribué à l'amélioration de la santé de l'homme et de l'animal et à l'évolution économique des élevages. Mais, après l'utilisation croissante dont ils ont été l'objet dès le début des années 50, des effets indésirables sont apparus. Les antibiotiques se sont d'une part révélés toxiques à forte dose ou lors d'utilisation prolongée, et d'autre part, les bactéries habituellement sensibles sont devenues résistantes aux antibiotiques fréquemment utilisés.

Les infections déclenchées par les bactéries pathogènes sont plus difficiles à juguler, nécessitant l'augmentation des doses, la prolongation de la durée des traitements, le recours éventuel à des molécules plus récentes, autant de facteurs qui accroissent le coût des traitements. De plus, les phénomènes de résistance nécessitent la synthèse de molécules nouvelles chimiquement plus élaborées et là encore plus coûteuses.

L'utilisation généralisée des antibiotiques aussi bien en thérapeutique qu'en prophylaxie s'est simultanément traduite par une proportion croissante de bactéries saprophytes résistantes au sein des différentes flores commensales de l'homme et des animaux.

1. Définition de l'antibiorésistance

Une bactérie résiste à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d'une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique. (CHABBERT; 1973). Seule, une partie des bactéries présentant une résistance génétique ainsi définie est susceptible d'échapper à la thérapeutique et rentre dans la catégorie de la résistance "clinique".

2. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques

Le déterminisme génétique de la résistance est localisé tel que l'indique le tableau n° 2:

a. Au niveau du chromosome bactérien.

La résistance chromosomique peut être acquise par mutation correspondant à la modification ou à la perte d'un gène, survenant au hasard pendant la réplication du chromosome.

C'est un phénomène rare et cette mutation peut altérer l'information génétique endogène et modifier les protéines de la bactérie entraînant une modification de la perméabilité ou de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible d'action

- par transduction,
- par transformation,
- par conjugaison.

b. Au niveau de plasmides ou transposons.

Information génétique exogène acquise le plus souvent par conjugaison chez les Entérobactéries. Cette information entraîne la synthèse de protéines nouvelles pouvant inactiver l'antibiotique ou se substituer à sa cible naturelle.

Les plasmides bactériens sont par ailleurs le support d'une large variété de caractères qui confèrent à la bactérie hôte une grande souplesse génétique (SORIN et PANISSET, 1980). En pathologie infectieuse, les plasmides les plus étudiés sont ceux qui confèrent la résistance aux antibiotiques (plasmides ou facteurs R) mais également des facteurs de pathogénicité (entérotoxines, adhésines, aérobactines), la sensibilité aux phages et aux bactériocines, des caractères métaboliques nouveaux (par exemple, la fermentation du lactose chez salmonella ou la production d'une uréase chez E. coli).

Tableau n°2: Résumé des mécanismes biochimiques de l'antibiorésistance (Richard, 1986).

Antibiotiques	Mécanismes	Support Génétique
β lactamines (Ampicilline)	β lactamase	Chromosome et Plasmides
Aminoside (Streptomycine)	Modification du site d'action (3OS)	Chromosome
Kanamycine Gentamycine)	Acétyl transférases Phospho Transférases nucleotidyl	Plasmide
Chloramphenicol	Perte de perméabilité Hydrolase-Réductase	Chromosome
	Acétyl transférase	Plasmide
Tétracycline	Perte de perméabilité	Plasmide
Macrolides et apparentés	Modification de la cible (5OS)	Chromosome
	Méthylase	Plasmide
Sulfamides	Modification de la cible	Plasmide
	Hyperproduction Diminution de l'affinité pour l'enzyme de synthèse (DHPS)	Chromosome

Depuis leur découverte au Japon en 1959 selon WATANABE (1963), il est clairement établi que les plasmides R sont responsables de la grande majorité des résistances observées chez les Entérobactériaceae. Le tableau n° 3 indique la liste, relativement limitée, des antibiotiques pour lesquels aucune résistance plasmidique n'a été détectée. En outre, les plasmides peuvent conférer, par transfert interspécifique et intergénérique, la résistance à un ou plusieurs antibiotiques appartenant à des familles différentes: on parle de résistance multiple et infectieuse. De ce point de vue les plasmides R des Entérobactéries peuvent être divisés en deux groupes selon COURVALIN et coll. (1985).

b.1 Les plasmides conjugatifs ou autotransmissibles.

Codant pour les fonctions nécessaires à leur transfert. Ces plasmides ont une taille supérieure à 30 kb, mais sont souvent de l'ordre de 90 kb; leur transfert est généralement réprimé et ne s'observe qu'avec une fréquence de l'ordre de 10^4 par donneur.

b.2 Les plasmides non conjugatifs.

De taille inférieure, d'un poids moléculaire variant de 1 à 70 kb, mais fréquemment de l'ordre de 7 à 10 kb, codant rarement pour la résistance à plus de deux familles d'antibiotiques. Ces plasmides ne peuvent être transférés qu'après mobilisation par un plasmide conjugatif présent dans la même cellule.

Les gènes de résistance peuvent être portés par des séquences d'ADN de petite taille (transposons de 2,5 à 20 kb), capables de se transposer d'un réplicon à l'autre grâce à la possession d'information pour les enzymes impliquées dans le mécanisme de la transposition (transposase, résolvasse) et de la régulation; ce sont donc des gènes capables de "sauter" de plasmide à plasmide, de chromosome à

Tableau n°3: Antibiotiques vis à vis desquels aucune résistance plasmidique n'a été détectée (d'après Courvalin et coll., 1985).

Familles	Antibiotiques
Polypeptides	bacitracine colistine polymyxine B
Quinolones	acide nalidixique acide oxolinique acide piromidique fluméquine acide pipémidique
Nitrofuranes	furazolidone furaltadone nitrofurazone
Divers	novobiocine rifampicine vancomycine

chromosome et de plasmide à chromosome. Ce phénomène participe à la dissémination de la résistance aux antibiotiques (POHL et coll., 1975; POHL et coll., 1977).

La transposition peut s'effectuer sur tous les réplicons sans nécessiter d'homologie entre les ADN qui interagissent, d'où la présence de caractères de résistance identiques sur des plasmides non apparentés. Pour un replicon donné, la transposition peut s'effectuer en divers endroits mais il existe des zones privilégiées. Lorsque le transposon s'intègre dans le chromosome bactérien, il devient partie du patrimoine héréditaire de la bactérie et se transmet de façon stable à sa descendance (POHL et THOMAS, 1977).

En conclusion, la transposition et le transfert plasmidique entraînent une répllication de l'information génétique: le donneur et le receveur se retrouvent chacun en possession d'une copie de l'information qui devient héréditaire. Il s'agit donc de moyens très efficaces de dissémination de la résistance (LAFONT, 1984; ABHAGAUUR et coll., 1992; KAREN et coll., 1995).

3. Evolution de l'antibiorésistance

Entre 1950 et 1956, on notait l'apparition, suivant l'usage thérapeutique, de la résistance aux pénicillines, aux tétracyclines, à la néomycine et à la furazolidone chez les colibacilles responsables d'entérites chez le veau (SINKOVICZ, 1974). En Belgique, chez les colibacilles isolés de septicémies de veaux de 1967 à 1971, POHL et coll. en 1972 observent une augmentation de l'antibiorésistance avec une tendance à la multirésistance.

En 1981, MARTEL en France, dans une enquête portant sur les colibacilles entéropathogènes, observa également l'importance de la résistance aux antibiotiques chez ces bactéries. En Angleterre, pour les colibacilles d'origine animale, JACKSON (1981), montre une fréquence élevée de résistances aux principales familles d'antibiotiques et les différences existantes suivant l'origine animale.

VI. LES PATHOLOGIES COLIBACILLAIRES

Escherichia coli, hôte normal de l'intestin, est associé à de nombreuses pathologies intestinales et extra-intestinales, tant chez l'homme que chez les animaux domestiques (GERMANI et coll., 1985; POHL et coll., 1987; DEBROY et coll., 1994; KUDVA et coll., 1995).

Au cours des dix dernières années, les travaux de recherche ont essentiellement porté sur les souches dites entérotoxigènes (ETEC) qui sont productrices d'une entérotoxine et d'adhésines permettant la colonisation sélective de l'intestin grêle des animaux (ROBERTSON, 1988; JALLAT et coll., 1994; THOMAS et coll., 1994). En plus des entérotoxines, d'autres facteurs de virulence sont également très étudiés. Il s'agit des colicines, en particulier la Colicine V (FREDERICQ, 1957; PATTUS et coll., 1990), des hémolysines, des adhésines, les sidérophores (CONTREPOIS et coll., 1986; GUTH et coll., 1994; MOHAMED OUSSAID et coll., 1994).

1. Les hémolysines

a. Présentation

Certaines souches d'*E. coli* sont capables de produire une hémolysine identifiable par le halo d'hémolyse produit autour des colonies cultivées sur gélose au sang. En médecine vétérinaire, le rôle pathogène des souches hémolytiques d'*E. coli* a été assez peu étudié, tant sur le plan épidémiologique que sur le plan pathogénique, et ceci malgré les travaux pionniers de SMITH (1963) sur des souches d'origine animale. Les données générales sur le rôle de l'hémolysine dans la virulence des souches productrices et sur son déterminisme génétique méritent d'être rappelées ici dans la mesure où elles peuvent s'appliquer à la pathologie vétérinaire. Il existe plusieurs revues bibliographiques assez récentes sur l'hémolysine d'*E. coli* et son rôle dans la virulence (CAVALIERI et coll., 1984; HACKER et HUGHES, 1985; CHAKRABORTY et coll., 1987).

b. Déterminisme génétique

La production d'hémolysine de type β (hly) par *E. coli* de nature plasmidique est sous la dépendance d'un groupe de 4 gènes de structure désignés hlyC, hlyA, hlyB, hlyD. Les gènes HlyA et hlyC codent pour la synthèse de l'hémolysine activée tandis que les produits des gènes B et D seraient responsables de la sécrétion de l'hémolysine dans le milieu extérieur (HACKER et HUGHES, 1985).

c. Association avec la pathologie.

Ce caractère qui n'est pas recherché systématiquement n'a pas la même importance selon l'animal considéré. SMITH en 1963 avait évalué l'incidence des colibacilles hémolytiques dans les fécès de bovins, porcs, moutons et poulets à respectivement 76, 63, 53 et 0%, ce qui montre que ces souches sont fréquemment excrétées chez les 3 premières de ces espèces. Ultérieurement, on a observé que chez le porc, les souches entérotoxigènes et celles associées à la maladie de l'oedème étaient fréquemment hémolytiques (SMITH et LINGGOOD, 1971; LECCE et coll., 1982). Il faut penser que ce facteur à lui seul chez le porc n'est pas significatif selon CHIKHI. Plus récemment, l'association du caractère hémolytique avec la production CNF₁ a été mise en évidence dans les souches isolées de fécès de veaux diarrhéiques (DE RYCKE et coll., 1987). Enfin le caractère hémolytique semble aussi associé aux souches uropathogènes du chien, comme chez l'homme. En effet, sur 17 souches responsables d'infection urinaire chez le chien GARCIA et coll. (1988) aux Pays-bas notent que 13 sont hémolytiques.

d. Role de l'hémolysine dans la virulence des souches productrices.

D'après certains auteurs, les souches entérotoxigènes de porcs (entérotoxines LT ou STa) ainsi que les souches responsables de la maladie de l'oedème sont fréquemment hémolytiques. Cependant, l'hémolysine ne semble pas être à l'origine des troubles observés dans ces 2 types de pathologies, ainsi que le démontrent les infections ou intoxications expérimentales de SMITH et LINGGOOD (1971) et de KURTZ et SHORT (1976).

En revanche il existe de nombreuses démonstrations expérimentales du rôle de l'hémolysine dans la virulence extra-intestinale des souches productrices dans des modèles de laboratoire utilisant la souris et le rat (CAVALIERI et coll., 1984). Les premières expériences mettaient à profit le déterminisme plasmidique de l'hémolysine dans certaines souches sauvages. Le transfert de ces plasmides par conjugaison conférait dans certains cas un surcroît de virulence aux souches réceptrices, notamment dans leur aptitude à coloniser le rein après injection par voie parentérale (VAN DEN BOGH et coll., 1981; LINGGOOD et INGRAM, 1982, WAALWIJK et coll., 1982) in DE RYCKE 1991. Dans d'autres cas, le transfert de plasmides Hly a été sans effet sur la virulence (SMITH et HALLS, 1967). Ces expériences, même quand elles sont concluantes quant à la contribution du plasmide dans la virulence, ne démontrent pas formellement le rôle de l'hémolysine.

2. Les colicines

Les colicines sont des bactériocines, de nature protéique, douées d'activité antibiotique, détruisant d'autres bactéries telles que *Salmonella*, *Shigella* ou même d'autres colibacilles (LE MINOR, 1984). Parmi les colicines souvent décrites, on peut citer les colicines V, A, B, Ia, Ib, K, N et E1 (PATTUS et coll., 1990). Comme les

facteurs F, les facteurs Colicinogènes étaient décrits avant d'être reconnus comme étant codés par des molécules d'ADN extrachromosomiques (FREDERICQ, 1957). La colicine V a été la première décrite en 1925 par GRATIA, chez les coliformes; elle cause une lyse cellulaire analogue à celle des bactériophages. Les colibacilles produisant la colicine V, en plus du fait qu'ils soient généralement isolés des pathologies extraintestinales humaines (MILCH et coll., 1984), ou animales (SMITH, 1974), il est établi que la col V n'est pas directement impliquée dans le pouvoir pathogène (CHERIFI et coll., 1990; CHERIFI, 1991).

Les travaux de ces dernières années ont démontré que le gène col V pouvait être porté par des plasmides (VIRGINIA et coll., 1991), en association avec des gènes de virulence codant pour la production de Sidérophores (WILLIAMS, 1979; ALBRECHT BINDEREIF et coll., 1982), la résistance aux effets bactéricides du sérum (BINNS et coll., 1982), des facteurs de colonisation de l'intestin (CONTREPOIS et coll., 1986; MOHAMED OUSSAID, 1994), des propriétés hydrophobes rendant les bactéries auto-agglutinantes et de ce fait résistantes à la phagocytose (ROWBURY et coll., 1985) in CONTREPOIS et coll., (1986). Enfin ces plasmides codant pour la col V font partie d'un groupe hétérogène de grands plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité IncFI (VIRGINIA et coll., 1991).

ETUDE
EXPERIMENTALE

C. ETUDE EXPERIMENTALE

I. PRELEVEMENT

1. Matériel utilisé

- Boîtes de Pétri.
- Ecouvillons.
- Glacière.

Remarque: tout le matériel utilisé est stérile.

2. Nature et lieu des prélèvements

Nous avons effectué des prélèvements de matières fécales dans la ferme d'Etat "Hammadouche" située à Saf Saf, à 10 kilomètres environ à l'est de Tlemcen, sur une période de 6 mois s'étendant de Janvier à Juin 1991.

Les prélèvements systématiques ont été effectués chez 6 veaux nés pendant cette période.

Pour des raisons de commodité, nous les avons numérotés de V₁ à V₆. Des lettres que nous conserverons dans la suite du travail ont servi à distinguer les différents prélèvements.

Nous les avons réalisés avec le souci de suivre l'installation et l'évolution des coliformes jusqu'au 45^e jour, quand cela a été possible. Ces prélèvements, ont été appelés a, b, c, d, exemple pour le veau 1: V_{1a}, V_{1b}, V_{1c}...

Ils ont été en moyenne de 10 par veau tel que le montre le Tableau n° 4a.

3. Technique de prélèvement

Les prélèvements de matières fécales sont recueillis dans une boîte de Pétri stérile à la sortie de l'anus, soit au moment même de leur émission spontanée soit, après excrétion provoquée par l'introduction et la rotation d'un écouvillon stérile dans l'orifice anal de l'animal.

**Tableau n° 4a: Prélèvements chez les veaux
et leurs caractéristiques**

* = Diarrhée

Veau	Date de Naissance	Age	Ref	Nature du prélèvement	Caractéristiques	Régime Alimentaire
V ₁	28-01-92 16 heures	19 h	V _{1a}	excréments	Pas de diarrhée	colostrum
		23 h	b	(méconium)		colostrum
		44 h	c	Excréments		colostrum
		03 j	d	"		lait de vache
		04 j	e	"		lait de vache
		07 j	f	"		lait de vache
		08 j	g	"		lait reconstitué + concentré
		12 j	h	"		
		15 j	i	"		
		19 j	j	"		
		28 j	k	"		lait reconstitué + concentré + foin
V ₂	01-02-92 à 10 ^h 15	04 h	V _{2a}	Méconium	* Diarrhée (traitement aux sulfamides), Mort 2 jours après le dernier prélèvement (Septicémie) Selles jaunâtres Diarrhée non sanguinolante	
		30 h	b	Excréments		
		03 j	c	"		
		04 j	d	"		
		05 j	e	"		
		09 j	f*	"		
V ₃	07-02-92 03 heures	36 h	V _{3a}	Méconium	* Diarrhée non sanguinolante	
		03 j	b	Excréments		
		04 j	c	"		
		05 j	d	"		
		06 j	e	"		
		09 j	f*	"		Signes de faiblesse (Poids faible), Diarrhée, Signes de déshydratation, Mort le lendemain du dernier prélèvement (Pneumopathie).
		10 j	g	"		
16 j	h*	"				

**Tableau n° 4a (suite): Prélèvements chez les veaux
et leurs caractéristiques**

* = Diarrhée

Veau	Date de Naissance	Age	Ref	Nature du prélèvement	Caractéristiques	Régime Alimentaire
V ₄	17-02-92 03 heures	13 h	V _{4a}	Méconium	Pas de diarrhée. Aucune pathologie signalée	
		31 h	b	Excréments		
		38 h	c			
		03 j	d			
		05 j	e	"		
		06 j	f			
		10 j	g*			
		15 j	h			
		20 j	i	"		
		29 j	j			
		45 j	k			
V ₅	22-02-92 01 heure	12 h	V _{5a}	Méconium	Pas de diarrhée signalée	
		31 h	b	Excréments		
		40 h	c			
		03 j	d			
		04 j	e	"		
		05 j	f			
		10 j	g			
		15 j	h			
		19 j	i	"		
		30 j	j			
		45 j	k			
V ₆	24-02-92 18 heures	14 h	V _{6a}	Méconium	Diarrhée passagère dûe certainement au changement d'alimentation.	
		38 h	b	Excréments		
		04 j	c			
		05 j	d			
		07 j	e*	"		
		12 j	f			
		16 j	g			
		21 j	h			
		30 j	i	"		
		43 j	j			

**Tableau n° 4b: Caractéristiques du lait en poudre utilisé
dans l'alimentation du veau.**

Matières protéiques brutes		24 %
Matières grasses + antioxydants		20 %
Matières minérales		8 %
Humidité		6 %
SUPPLEMENTATIONS (aux 100 Kgs)		
Vitamines	A (UI)	4 000 000
	D ₃ (UI)	500 000
	E (mg)	3 000
Additifs	Spiramicine (mg)	6 000
	Virginiamycine	2 000

Remarque: Dans la plupart des cas, il ne nous a pas été possible de connaître le mode de distribution de l'aliment lacté et le lait en poudre utilisé pendant la période de l'étude comprend les caractéristiques ci-dessus.

4. Acheminement

L'analyse des échantillons commençait généralement le jour même du prélèvement au laboratoire de microbiologie de l'institut de Biologie de Tlemcen.

II. DENOMBREMENT

1. Matériel et milieux utilisés

- Milieu Drigalsky (Institut Pasteur d'Alger).
- Liquide de Ringer au 1/4.
- Pipettes graduées de 1 ml.
- Vortex.
- Pipettes Pasteur.
- Boîtes de Pétri.
- Ecouvillons.

2. Technique

On réalise la dilution au 1/10 en mettant 1 g. de fèces dans 9 ml de liquide de Ringer.

Après avoir effectué des dilutions successives jusqu'à 10^{-7} , avec homogénéisation et changement de pipette à chaque fois, 0,1 ml de chacune des trois dernières dilutions estensemencée en parallèle par étalement homogène à l'aide d'une pipette râteau dans 2 boîtes contenant de la gélose Drigalski.

Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures.

3. Lecture

Le dénombrement est effectué sur les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies. Les chiffres retenus sont la moyenne des 2 résultats si ceux-ci sont du même ordre. Dans le cas d'une différence importante, la numération n'est pas prise en compte.

L'aspect des colonies lactose positives, c'est à dire jaune sur le milieu utilisé, a été noté systématiquement.

4. Résultats et discussion

L'observation du Tableau n° 5, montre que la colonisation du tube digestif par les coliformes chez le veau nouveau-né, semble varier d'un animal à un autre, sans que nous puissions préciser le moment où elle a lieu.

L'absence des coliformes, peut être constaté jusqu'à la 14^e heure.

- 14 heures après la naissance, par analyse du méconium des veaux V₂, V₄, V₅ et V₆, une invasion massive et rapide est observée dans les prélèvements qui suivent, c'est à dire à partir de la 19^e heure; entre 130 10⁶ bact/g et 3248 10⁶ bact/g pour le 2^e jour respectivement pour les veaux V₄ et V₅. Pour ce dernier, le pic est atteint au 3^e jour avec 1600 millions de coliformes/g de fèces. Ceci est, peut être, en relation avec une protection immunitaire insuffisante jusqu'à ce moment (MARTEL, 1986).

Dès le 3^e jour, le nombre de ces germes décroît progressivement, pour tendre vers un équilibre, variable suivant l'état physiologique de l'animal (figure 1). Il s'établirait selon certains auteurs vers le 14^e jour et même plus tard, dans le cas où le veau ne connaît pas de diarrhée néonatale. D'après nos résultats, dont on peut voir l'évolution grâce aux courbes de la figure 1, un premier plateau s'établit entre le 3^e jour et le 10^e jour, avec un nombre moyen de 300 10⁶ germes, puis un 2^e plateau au delà du 20^e jour après la naissance, avec un nombre moyen de 30 10⁶ germes, la teneur définitive étant de l'ordre de quelques millions par gramme d'excréments chez les veaux n'ayant pas connu de diarrhées.

Tableau n° 5: Numération bactérienne en fonction de l'âge.

■ diarrhée

(Les chiffres sont exprimés en million (10^6)).

âge veaux	4h	12h	13h	14h	19h	2 ^e j	3 ^e j	4 ^e j	5 ^e j	6 ^e j	7 ^e j	8 ^e j	9 ^e j	10 ^e j	11 ^e j	12 ^e j	15 ^e j	16 ^e j	19 ^e j	20 ^e j	21 ^e j	28 ^e j	29 ^e j	30 ^e j	43 ^e j	45 ^e j	
	V ₁					800	2700	1740;325	380		200		74				28	20		41			58				
V ₂	0					1070	360	252	370				119		120							MORT					
V ₃						800	410	264	48	360			523	52				960				MORT					
V ₄			0			3248	2040;380		31	40				32			22			6			28				2
V ₅		0				130	1600;300	130	200					230			40		106						310		50
V ₆				0		530		26	24		500					30		39			50				36	5	

Ces résultats concordent assez bien avec ceux de CHIKHI (1978) et RAIBAUD (1984) qui sont en faveur d'une contamination massive dès les premières heures qui suivent la naissance, et qui commencerait à partir de l'iléon.

Les causes de ces fluctuations sont multiples, la particularité de chaque individu, le moment de l'allaitement, la puissance et la rapidité du transit intestinal et, par conséquent, le moment du prélèvement.

Aussi, l'évolution générale est analogue à la flore du rectum, rapportée par CONTREPOIS et GOUET (1973) avec un décalage dans le temps. Pour eux, le maximum de cette flore colibacillaire est atteint le 5^e jour seulement.

On peut également rapporter ici des résultats d'analyse effectués sur des nourrissons par BORDERON en 1974 et TURCK en 1984, révélant que les coliformes s'installaient chez 50% des nouveau-nés au cours des premières 24 heures et 100% au bout de 48 heures avec une concentration moyenne de 10^6 à 10^8 g/gr de fèces (TERKI HASSAINE 1991). Cette différence n'est pas surprenante puisque la composition et le niveau d'une microflore digestive dépend de l'hôte étudié et de ses conditions de vie, en particulier de son état physiologique et son environnement.

III. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION

1. Milieux utilisés et réactifs

La plupart des milieux ont été fournis par l'Institut Pasteur d'Alger.

- Gélose ordinaire pour la conservation des souches.
- Gélose éosine au bleu de méthylène (E.M.B.).
- Eau peptonnée exempte d'indole.
- Milieu TSI.
- Citrate de Simmons.
- Milieu mannitol-mobilité.

- Milieu urée-indole.
 - Eau peptonée au rouge de phénol.
 - Milieu de Falkov pour la recherche de l'arginine dihydrolase (ADH), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'ornithine décarboxylase (ODC).
 - Disques d'ONPG.
 - Languettes de gélatine.
 - Solutions de sucres stériles à 20% en ampoules; Glucose (Glu), Mannitol (Man); Inositol (Ino), Sorbitol (Sor), Rhamnose (Rha), Saccharose (Sac), Arabinose (Ara), Melibiose (Mel).
 - Réactifs pour l'identification:
 - Réactif d'Erlich Kovacs pour la recherche d'Indole.
 - Perchlorure de fer pour la recherche de la tryptophane désaminase (TDA).
 - α naphthol à 6%.
 - Lessive de potasse à 40%
 - Rouge de méthyle.
 - Huile de vaseline pour les épreuves nécessitant l'anaérobiose (ADH, LDC, ODC).
- } Test de Vosges-Proskauer

2. Méthodes

Pour identifier nos souches, nous avons utilisé uniquement la méthode classique faute de disposer de galeries API 20E.

a. Réisolement et sélection des souches à identifier

A partir des boîtes de Drigalski, comportant des colonies bien isolées, nous avons prélevé 10 colonies lactose positives au hasard, dans la mesure du possible. Celles-ci sont réisolées sur gélose EMB en vue de leur identification et incubées 24 heures à 37 °C.

b. Test biochimiques

Dans tous les cas, l'incubation se fait à 37 °C pendant 18 à 24 heures. L'identification est effectuée à partir d'une culture jeune de 18 heures issue d'une colonie isolée sur EMB ou d'une culture en gélose nutritive inclinée, milieu sur lequel nous avons conservé nos souches à 4 °C.

b1. Test des 3 sucres (TSI)

Le milieu TSI est ensemencé en piqûre centrale et en stries sur la pente. Ce test permet la mise en évidence de l'utilisation du glucose, du lactose et du saccharose, avec ou sans dégagement de gaz, qui se traduit par une coloration jaune due à l'acidification du milieu au niveau du culot pour l'utilisation du glucose, sur la tranche pour les 2 autres sucres. La production de gaz est signalée par la présence de bulles de gaz dans le culot. La production d'hydrogène sulfuré se révèle par une coloration noire due à la formation de sulfure de fer, par réduction du sulfate ferreux présent dans le milieu.

b2. Recherche de la production d'Indole

Les tubes d'eau peptonnée exempte d'indole sont ensemencés avec les souches à étudier. Après incubation 24h à 37 °C et adjonction de quelques gouttes de réactif de Kovacs, la présence d'indole, révélant la dégradation du tryptophane, se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface.

b3. Recherche des produits de fermentation du glucose

Elle se fait sur milieu de Clark et Lubs. La culture de 24 heures qui en résulte est fractionnée en deux parties.

- Dans le premier tube, on ajoute du rouge de méthyle; une fermentation acide avec une forte baisse du pH se manifeste par une réaction positive c'est à dire rouge.

- Le deuxième tube sert à la recherche de la fermentation butylène glycol, avec formation d'acétoïne qui se colore en rose après addition des réactifs de Voges-Proskauer.

b4. Test au citrate de Simmons

L'utilisation du citrate, comme seule source de carbone est recherchée en ensemençant en stries le milieu de Simmons.

Après incubation, l'utilisation du citrate se traduit par la libération des ions OH^- qui alcalinisent le milieu, en le faisant virer au bleu.

b5. Recherche de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH)

Pour la recherche de ces enzymes, le test de Falkov a été pratiqué. Trois tubes contenant du glucose, du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH, et l'un des acides aminés suivants: ornithine, lysine et arginine, ont été ensemençés en présence d'un tube témoin exempt d'acide aminé. Tous sont recouverts d'huile de vaseline.

Dans un premier temps, l'acidification du milieu due à l'utilisation du glucose entraîne une coloration jaune, ensuite, si l'un des acides aminés est utilisé, la libération de produits basiques, aminés en particulier, alcalinise le milieu d'où l'apparition d'une couleur violette.

b6. Recherche de l'uréase et de la tryptophane désaminase

Le milieu urée-indole est ensemençé avec quelques gouttes de culture et est recouvert d'huile de vaseline pour créer l'anaérobiose.

Après incubation, la mise en évidence de l'uréase repose sur l'alcalinisation du milieu qui se traduit par une coloration rouge violacée.

La desamination du tryptophane est détectée après l'adjonction de quelques gouttes de perchlorure de fer par l'apparition d'une coloration brun acajou.

b7. Test Mannitol-mobilité

Ce test permet à la fois de tester l'utilisation du mannitol qui se traduit par une acidification entraînant un virage au jaune de l'indicateur et la mobilité qui se traduit par une diffusion vers la périphérie à partir de la piqûre centrale d'ensemencement.

b8. Hydrolyse de la gélatine

Des languettes de film de gélatine imprégnées de charbon sont immergées dans la suspension bactérienne. Après incubation à 37 °C au bain marie ou à l'étuve de 4 jours, le pouvoir protéolytique se manifeste par la libération de particules de charbon due à l'hydrolyse de la gélatine qui donne à la suspension bactérienne un aspect gris noir en même temps que la partie immergée du film devient transparente.

b9. Test d'utilisation des différents sucres

Des tubes d'eau peptonnée, contenant du rouge de phénol comme indicateur de pH, additionnés stérilement du sucre à tester à raison de 1%, sont ensemencés avec une goutte de culture bactérienne jeune. Après incubation de 24 à 48 h à 37 °C, l'utilisation du sucre se traduit par une acidification franche, c'est à dire par un virage au jaune de l'indicateur de pH.

Remarque: les test retenus correspondent à ceux de la galerie API système 20E, à l'exception de l'amygdaline qui était indisponible, ce qui nous a permis d'utiliser le même système d'identification.

A l'aide des résultats, on peut constituer un code d'identification à 7 chiffres indiquant le type biochimique qui nous permet de faire le suivi de la microflore étudiée (voir récapitulatif Tableau n° 6).

Tableau n°6: Récapitulatif des tests d'identification

	TESTS	REACTIFS A AJOUTER	REACTIONS	
			Positive	Négative
ONPG	β galactosidase		jaune	incolore
ADH	Arginine dihydrolase		rouge	jaune
LDC	Lysine décarboxylase		rouge	jaune
ODC	Ornithine décarboxylase		rouge	jaune
CIT	Citrate (Simmons)		bleu	vert
H ₂ S	Formation H ₂ S		dépôt noir	absence
URE	Uréase		rouge	orange
TDA	Tryptophane désaminase	1à2 gttes de perchlorure de fer	brun	jaune orange
IND	Indole	1à2 gttes de Kovacs	anneau rouge	anneau jaune
VP	Acétoïne	1à2 gttes potasse+1à2 gttes α naphthol	rose rouge après 10mn	incolore
RM	Acides mixtes	1à2 gttes de Rouge de méthyle	rouge	orange jaune
Gel	Gélatine		diffusion pigment	pas de diffusion
Glu	Glucose		jaune	rouge
Man	Mannitol		jaune	rouge
Ino	Inositol		jaune	rouge
Sor	Sorbitol		jaune	rouge
Rha	Rhamnose		jaune	rouge
Sac	Saccharose		jaune	rouge
Ara	Arabinose		jaune	rouge
Mel	Melibiose		jaune	rouge

3. Résultats et discussion

a. Nombre de coliformes identifiés

La méthode utilisée nous a permis d'étudier 520 souches qui ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Escherichia coli*.

b. Répartition des colibacilles en fonction du type biochimique

Pour pouvoir faire une étude comparative avec les travaux effectués dans ce domaine, nous avons donc décidé d'utiliser le codage API des types biochimiques.

CHIKHI (1978), dans une étude comparative entre méthode API 20 E et méthode classique, sur environ 1500 souches, a montré que les deux méthodes donnent des résultats comparables dans 90% des cas.

Ainsi, les 20 caractères biochimiques d'identification nous ont permis de distinguer 19 chimiotypes (Tableau n° 7) au lieu de 12 chez l'humain pour un nombre de souches sensiblement équivalent 520 contre 538. Pour un nombre de souches deux fois plus élevé CHIKHI (1978) a identifié selon le même principe 39 biotypes.

Nous pouvons donc affirmer que la diversité en biotypes est plus importante chez le nouveau né bovin par rapport à l'humain. Cela peut être en rapport avec le type d'hôte et ses caractéristiques physiologiques mais aussi avec le milieu plus ouvert du bovin.

La diversité plus grande observée par CHIKHI peut être en rapport avec un plus grand nombre de souches étudiées mais aussi avec un caractère supplémentaire pris en considération, l'amygdaline bien que peu important, peut jouer un rôle qualitatif non négligeable.

L'analyse des caractères retenus pour l'étude permet d'en distinguer 3 catégories avec leurs proportions relatives que nous avons indiquées sur le Tableau n° 8.

Tableau n° 7: Corrélation entre les différents types de colibacilles et les caractères biochimiques.

Car. Bioch. Type Bioch.	n	%	ONPG	ADH	LOC	OOC	IND	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
5144572	193	37.11	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5144552	103	19.80	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
5044552	67	12.90	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
5044572	51	9.80	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
1144552	23	4.42	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
1144572	19	3.65	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5144542	16	3.07	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
5144562	15	2.88	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
1044552	7	1.34	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
7044552	6	1.15	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
5044542	4	0.77	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
5144772	3	0.57	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
1144512	3	0.57	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
1144542	3	0.57	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
5044152	2	0.38	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
5144172	2	0.38	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
5104552	2	0.38	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
5104572	1	0.19	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5044562	1	0.19	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+

Cit (-), H₂S (-), URE (-), VP (-), GEL (-), TDA (-)

Tableau n°8: Comportement des colibacilles vis à vis des épreuves utilisées.

Car. Variables	ADH	LDC	ODC	IND	INO	SOR	RHA	SAC	MEL
Rés. Personnels	1,15%	89,42%	73,46%	99,4%	0,5%	99,2%	92,5%	54,6%	99,4%
Veaux (Chikhi)	1,9%	88,9%	64,6%	97,2%	0,2%	96,4%	82,5%	55,8%	97,9%
Nourrison (Terki-Hassaine)	3%	85%	54,3%	100%	0%	92,2%	94,6%	29%	99,6%

- Caractères positifs: ONPG, GLU, MAN, ARA
- Caractères négatifs: CIT, H₂ S, URE, TDA, VP, GEL

- ceux qui sont constamment positifs,
- ceux qui sont constamment négatifs,
- ceux qui sont variables.

Elle nous fait noter également qu'aucune des souches de colibacilles isolées n'est atypique par la production d'hydrogène sulfuré, comme l'ont déjà signalé STOLER et coll. en 1972 et ISENBERG et coll. en 1974 in CHIKHI en 1978. Quelques unes de nos souches sont non indologènes.

En revanche, certaines souches ont pu fermenter l'inositol, et plus particulièrement celles qui correspondent au type 5144772 dans 0,57% des cas.

Si l'on compare nos résultats à ceux obtenus par CHIKHI (1978) à partir de 1200 souches isolées du veau nouveau-né, et à ceux de TERKI-HASSAINE (1991), chez le nourrisson, on peut constater:

1. Que les colibacilles issus des veaux fermentent le saccharose dans 54,6% des cas, résultats confirmant les 55,8% obtenus par CHIKHI en 1978 chez le même animal.
2. Que ce résultat est nettement différent chez l'humain où il est seulement de 29% selon TERKI-HASSAINE. Ceci peut être en rapport avec le régime alimentaire éventuellement l'absence de saccharase chez les bovins, ce qui permettrait à la microflore ayant ce caractère de l'exprimer en présence de ce sucre.
3. Bien que le nombre de souches fermentant l'inositol ne soit pas important chez le nouveau-né bovin, elles n'ont pas été retrouvées chez l'humain. Des différences sont également observées au niveau de l'ornithine et la lysine. Le nombre de souches possédant une LDC est sensiblement le même chez les bovins (90%), contrairement à l'humain où il est relativement plus faible (85%). La différence est aussi significative au niveau de l'ODC entre les 3 études. Il semble que les souches issues des veaux soient plus aptes à dégrader l'ornithine que

celles de l'humain. Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par la différence de physiologie, éventuellement d'alimentation, sans négliger l'environnement.

Parmi les chimiotypes observés, tels que le montrent les Tableaux n° 7 et 10, nous pouvons distinguer 3 catégories.

b.1. Une catégorie englobant les chimiotypes dominants représentés sur le Tableau 9

Ces 4 chimiotypes forment l'essentiel de la flore colibacillaire totale soit 79,6%. Ces mêmes chimiotypes ont été retrouvés par CHIKHI (1978) et TERKI-HASSAINE (1991), formant respectivement 73,2% et 73,9% de la microflore colibacillaire. Le pourcentage de chimiotypes dominants trouvés ne présente qu'une faible différence, celle-ci pouvant être due à la méthode. Les deux auteurs précédents ont utilisé pour une partie de leurs résultats la microméthode API. Il est évident que des différences en fonction de l'hôte et du lieu sont possibles.

Dans le classement des chimiotypes, on remarque que la différence se situe entre le biotype 2 et 3 dont la place est inversée et ceci en raison du comportement des souches vis-à-vis de l'ODC tel que nous l'avons signalé précédemment. En dehors du biotype 5144552 dont le taux est pratiquement le double par rapport au résultat rapporté par CHIKHI, les autres chiffres sont assez proches. Ceci peut être en rapport avec le lieu et les conditions de soins des animaux et d'alimentation. Par rapport au nouveau-né humain, le classement reste autre avec des proportions différentes. En effet, on remarque dans le cas des bovins que le type 5144572 est nettement dominant avec respectivement 37% dans notre cas et 39% pour CHIKHI (1978) en Normandie alors qu'il ne représente que 15,4% chez le nouveau-né humain.

**Tableau n° 9: Position des différents chimiotypes
en fonction de divers travaux.**

Position et % des chimiotypes	Veaux (Résultats personnels)	Veaux (Chikhi 1978)	Nourrissons (Terki-Hassaïne 1991)
5144572	1) 37,11%	1) 39,2%	3) 15,4%
5144552	2) 19,81%	3) 10,6%	1) 26,3%
5044552	3) 12,88%	2) 15,6%	2) 22,7%
5044572	4) 9,80%	4) 7,8%	5) 9,5%
TOTAL	79,6%	73,2%	73,9%
Nbre de chimiotypes total	19 (520 souches)	39/1200 souches	12/538 souches

Le 5044572 vient en 4^e position avec respectivement 9,8% et 7,8%, en 5^e position chez l'humain avec 9,5%.

Aussi le biotype 1044552 (ODC-, LDC-, SAC-), qui se retrouve en 4^e position chez le nourrisson avec 10,6%, se situe au 9^e rang dans notre étude et seulement au 19^e rang selon l'étude menée par CHIKHI chez les bovins avec des valeurs variant de 1,4% à 1,9%.

Il est important de souligner que les 3 principaux biotypes (5144572, 5144552, 5044552) dominent aussi bien chez le nouveau-né humain que chez les bovins, la seule différence réside dans le classement. Ceci est donc en faveur d'un pool de biotypes majoritaires commun chez le nouveau-né humain et bovin.

b2. Une deuxième catégorie comprenant 6 chimiotypes dont les proportions se situent entre 1 et 5%.

Parmi eux, le type 1144552 (4,43%). Sa présence simultanée avec le chimiotype 1144572 (3,65%) nous laisse supposer qu'il s'agit là d'un variant de ce dernier (Tableau n° 10). Ceci est possible, dans la mesure où ils ne diffèrent apparemment que par un seul caractère, la fermentation du saccharose qui se perd (CHIKHI, 1978). Il serait possible de le vérifier sur galerie API 50E.

b3. Dans la 3^e catégorie, il y a lieu de placer les types biochimiques rares dont les proportions sont inférieures à 1%.

Parmi eux, nous placerons le type 5144772 (0,57%) caractérisé par une LDC positive, une ODC positive, la fermentation du melibiose, du rhamnose, du saccharose et du sorbitol et surtout de l'inositol.

Nous signalerons aussi les souches non indologènes, provenant surtout du veau V₂, qui a présenté des signes de diarrhée. Ce type de souches a été également retrouvé chez les veaux diarrhéiques par CHIKHI au moment d'un traitement sévère aux antibiotiques.

La colonisation du tube digestif de l'animal se fait donc après la 19^e heure avec des biotypes variés et nombreux, En outre, la microflore des jeunes veaux se caractérisent par sa variété en chimiotypes. Le nombre moyen de ces derniers évalués sur des échantillons de 10 souches est de 3 en moyenne. Il peut être cependant de 7, comme chez le V_{5c} au 2^e jour, de 6 chez le V_{1a} au premier jour, et de 1 seulement chez les veaux V_{2f}, V_{2g}, V_{3h}, atteints de diarrhée.

Chez les veaux sains, ne présentant pas de symptômes diarrhéiques, ces biotypes ont tendance, au cours du temps, à changer et leur nombre à se réduire.

Notons aussi que d'autres types de coliformes n'aient pas été détectés malgré notre suivi de la microflore depuis la naissance tel que cela a été observé chez le veau avant 72 heures par CHIKHI et chez le nouveau-né humain par TERKI-HASSAINE. Ceci n'exclut pas leur présence mais peut être en rapport avec la taille de notre échantillon et le nombre de veaux étudiés relativement faible.

c. En fonction des veaux et de leur état physiologique

Chez les veaux malades (V₃) et surtout V₂, à partir des premiers signes de diarrhée on remarque une réduction du nombre de chimiotypes au profit d'un ou deux, devenant dominants. Dans le premier cas, il aurait été intéressant de déterminer les sérotypes en cause qui ne sont pas nécessairement les mêmes. Chez ces veaux malades, le type 5144572 est sélectionné à la phase critique de la diarrhée c'est à dire au cours des prélèvements V_{2e}, V_{2f}, V_{2g}, et V_{3b}, V_{3c}, V_{3f}, V_{3h}.

Ceci confirme les observations de CHIKHI concernant la sélection d'un biotype quel que soit le type de diarrhée (V₂, V₃, V₄) infectieux ou nutritionnel (V₆). Apparemment le traitement chez V₂ a été décidé trop tard puisqu'il n'a été commencé qu'au 11^e jour seulement alors que les signes de diarrhée avec dominance d'un chimiotype sont apparus au 5^e jour. Il en est de même pour V₃.

Tableau n° 10: Répartition des chimiotypes en fonction des veaux et de leur âge.

Chimiotypes \ Veaux	5	5	5	5	1	1	5	5	1	7	5	5	1	1	5	5	5	5	5
	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5	5	1	1	5	5	5
	7	5	5	7	5	7	4	6	5	5	4	7	1	4	5	7	5	7	6
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V ₁ a	1	3	2		2	1							1						
b	2	2	3									1	2						
c	0	0	5							2									
d	2	4	2																
e	1	6	3																
f	1	0						3											
g	6	4																	
h	7	1						2											
i	8	0					1	1											
j	5	2						3											
k	7	3																	
l	4	1	2												1	2			
V ₂ b	4	3															2	1	
c	0	1	7	1	0				1										
d	0	2			2	4			1										
e	8				0														*
f *	10				0														*
g *	10				0														*
V ₃ a	3	6											1						*
b	9	0											1						*
c	10																		*
d	7	3																	*
e		10																	
f *	3	4					3												
g	6	3																	
h *	10																		*

**Tableau n° 10 (suite): Répartition des chimiotypes en fonction
des veaux et de leur âge.**

Chimiotypes	5	5	5	5	1	1	5	5	1	7	5	5	1	1	5	5	5	5	5
	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5	5	1	1	5	5	5
	7	5	5	7	5	7	4	6	5	5	4	7	1	4	5	7	5	7	6
	Veaux	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V ₄ b	0	6					4												
c	1	4					3							2					
d	2	2		3						3									
e	6	0		1					3										
f	4	1							2					1				1*	
g t	0			10															
h	4	0		1		3				1									
i	2	1				3			0										
j	3	2					3												
k	3	2	2	1					2						1				
V ₅ b	1		6			1						2							
c	2		1	1	2		1	1			2								
d	4	3	1	2							2								
e	2	2	2	3	1														
f	0	3	1	1	5														
g	1	1	5		3														
h	0	4			4	2													
i	1			9														*	
j	1			9															
k	0		7	1			1		1										
V ₆ b	3	1		1	3	2													
c	6	1	1	1															
d	2	5	3																
e *	3	2	5																
f	10																		
g	4			6															
h	3	2			2	3													
i	0	1	8						1										
j	1	3	1																
TOTAL	193	103	67	51	23	19	16	15	7	6	4	3	3	3	2	2	2	1	1

Dès l'introduction du traitement, la diversification des chimiotypes a tendance à se rétablir.

Le veau V₄, qui a subi un traitement préventif aux sulfamides à la fin de sa première semaine de vie en raison d'une diarrhée infectieuse chez V₁ et V₃, présentait une flore où domine le type 5044572, mais cet état n'est que passager puisque 4 jours après le début du traitement, le nombre de chimiotypes s'est diversifié. Dans ce cas, comme on peut le voir dans le Tableau n° 11, V_{4g}, ce type ne réapparaîtra qu'un peu plus tard, mais en faible proportion.

Notons enfin, que ces observations ont été déjà rapportées par CHIKHI (1978) sur des veaux atteints de colibacillose subissant un traitement aux antibiotiques. Le biotype et le sérotype incriminés peuvent persister selon cet auteur dans la microflore sans redevenir dominants.

Toutes ces données nous permettent de dire qu'il existe une dominance biochimique lors d'une diarrhée sans que celle-ci ne soit spécifique d'un sujet ou d'un état.

il existe une dynamique évoluant dans le temps en fonction de l'état de l'animal, de son âge et de son environnement.

IV. RECHERCHE DE DEUX FACTEURS IMPLIQUES DANS LA VIRULENCE: HEMOLYSINE ET COLICINE

1. Hemolysine

a. Principe

L'hémolysine est une substance élaborée par E. coli isolée du milieu intestinal, celui du porc en particulier, ou extraintestinal.

LE MINOR (1974) rapporte l'existence de 3 types d'hémolysine.

- β : filtrable, antigénique, toxique par voie intraveineuse pour la souris, le lapin et le cobaye, dont la production serait codée par un plasmide Hly.

- α : liées aux cellules bactériennes non antigéniques.
- γ : décrite par WALTON et SMITH (1969), chez des mutants résistants à l'acide nalidixique, non active sur les globules rouges humains et de lapins.

b. Matériel et méthode

Sur le milieu "base" pour gélose au sang frais additionné de 5% de sang de mouton frais, les souches de colibacilles sont ensemencées en piqûre à la surface de la gélose. Après incubation de 24 heures à 37 °C, les colonies qui présentent une auréole transparente de lyse des hématies sont considérées comme hémolytiques.

c. Résultats et discussion

100 souches prises au hasard ont été testées, parmi lesquelles 60 sont issues de veaux sains et 40 issues de veaux diarrhéiques. Chez les premières, 3 se sont révélées hémolytiques et chez les veaux malades 2 seulement. Ces résultats montrent qu'il ne s'agit pas d'une propriété fréquente chez les colibacilles des bovins.

Les proportions de ces souches hémolytiques évaluées à 5% permettent de rejoindre les conclusions de CHIKHI (1978) qui a trouvé une proportion de 11% sur 160 souches testées. Selon lui, cette caractéristique ne suffit pas à elle seule à expliquer le caractère entéropathogène des souches.

Il n'y aurait pas de relation directe entre la production d'hémolysine et le pouvoir pathogène des colibacilles chez le veau nouveau-né atteint de colibacillose contrairement à d'autres animaux selon OUDAR et coll. (1974).

2. Colicines

a. Matériel

- Milieu de Luria à 7% d'agar-agar.

- Milieu de Luria à 15% d'agar-agar.
- Souche *Escherichia coli* K12XA sensible à toutes les colicines.
- Souche *Escherichia coli* colV^r, résistante uniquement à la colV.

b. Méthode

Elle est appréciée par la méthode de la double couche rapportée par CONTREPOIS et MOHAMED OUSSAID en 1986.

Les colibacilles sont ensemencés en "spot" à la surface d'un milieu gélosé de Luria. Après une incubation de 24 h à 37 °C, les cultures sont inactivées avec du chloroforme déposé sur le couvercle de la boîte retourné pendant 10 mn.

Ensuite, une deuxième couche de gélose molle de Luria de 5 ml environ est coulée. Après solidification, une suspension de la souche *E. coli* K12 sensible à toutes les colicines est coulée en nappe. Après incubation de 24 h à 37 °C, la présence de colicines se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la souche sensible autour du spot formée par la souche sauvage testée.

La colV est identifiée de la même façon sur les souches colicinogènes mais en utilisant un mutant de la souche *E. coli* K12 résistant à la colicine V.

L'expérience est refaite avec les souches productrices de colicines mais cette fois avec une souche *E. coli* K12 colV^r.

Les souches colicinogènes qui n'inhibent pas la croissance d'*E. coli* K12 colV^r sont considérées colV^r.

c. Résultats et discussion

Dans ce travail, nous n'avons recherché que les souches productrices de colicine V en raison de l'implication de ce facteur dans la virulence des colibacilles.

Sur 520 souches testées, 135 souches soit 26,8% sont productrices de diverses colicines. Parmi elles la moitié soit 13,4% sont colV⁺ (Tableau n° 11).

Chez le veau V₂ qui a subi un épisode de diarrhée infectieuse le nombre de souches colicinogènes observé est de 22 soit 40%.

Les résultats sont relativement plus élevés que ceux obtenus par MOHAMED OUSSAID (1988) à Clermont Ferrand chez le veau (23%), de ceux de SMITH en 1974 avec 18% et de MILCH et coll. en 1984 avec 20%. Cette différence pourrait s'expliquer par le mode de sélection des souches éprouvées.

CHIKHI, en opérant sur des séries de souches isolées au moment de la diarrhée colibacillaire trouve des résultats proches de 100%. Globalement, il rapporte un chiffre 216/410 positifs soit 54% donc assez proche du nôtre.

La production de la colV, étant gouvernée par un plasmide pouvant aussi être le support de gènes de virulence, ce n'est pas étonnant qu'elle puisse être également liée à des gènes de résistance aux antibiotiques, donc à des plasmides R (SMITH et HUGGINS, 1980, BINNS et HARDY, 1982).

Pour essayer de mettre en évidence ce rapport nous avons recherché, si ce caractère colicine était transférable avec les caractères de résistance et par conséquent, retrouvé en même temps chez les transconjugants, tel que nous l'avons montré dans le chapitre suivant sur l'antibiorésistance.

D'autres facteurs de virulence, que nous n'avons pas recherchés pourraient également être codés par les plasmides des transférés, notamment la production de sidérophores, la résistance à l'effet bactéricide du sérum, les adhésines... .

Tableau n° 11: Production de colicines en fonction des veaux

N° du veau		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	Total
Type de colicines								
col	n	39	22	13	27	21	17	139
	%	36,8	40,8	16,2	28,1	21	20,2	26,7
col V	n	24	10	5	11	7	13	70
	%	22,6	18,5	6,2	11,4	7	15	13,4

V. ETUDE DE L'ANTIBIORESISTANCE

1. Matériel et méthodes

a. Matériel

a.1. Matériel biologique

- E. coli K12 (souche réceptrice)
- Souches sauvages ou donatrices (voir tableau n°)

Remarque: Caractéristiques de la souche K12 Na^r qui provient du laboratoire de microbiologie de l'INRA de Theix-Clermont-Ferrand (France):

F⁻Δ (pro, lac), met B, Arg E (Am), Sup F, Na^r, Rif^r: elle est donc lactose négative, méthionine \ominus , proline \ominus , résistante à l'acide nalidixique et à la Rifampycine jusqu'à 100 µg/ml.

a.2. Les antibiotiques

Nous avons choisi de tester 9 antibiotiques, appartenant aux principales familles avec les traitements habituels. Les disques d'antibiotiques utilisés sont ceux fournis par l'Institut Pasteur d'Alger.

ANTIBIOTIQUES	FAMILLE	CHARGE EN µg DU DISQUE
Ampicilline (A)	β lactamines	10
Streptomycine (S)	Aminosides	100
Kanamycine (K)	Aminosides	30
Gentamycine (Gm)	Aminosides	30
Néomycine (N)	Aminosides	30
Chloramphénicol (C)	Phénicols	30
Tétracycline (T)	Tétracyclines	30
Colistine (Cs)	Polypeptides	50
Sulfamides forts (Su)	Sulfamides	200

a.3. Milieux et réactifs utilisés

- Milieu Mueller Hinton.
- Bouillon coeur-cerveau (Brain - Heart - Infusion).
- Eau physiologique à 9‰ en tube de 10 ml.
- Milieu Mc Conkey.
- Milieu de Drigalski.
- Gélose nutritive.
- Tampon d'électrophorèse.
- Solution de lyse.
- Mélange phénol-chloroforme (V/V).
- Bromure d'éthydiuim.
- Pourpre de bromocrésol.
- Glycérol 50%.
- Triacétate 50 mM pH 7,9.

b. Méthodes

b.1. Antibiogramme

Nous avons utilisé la méthode classique de diffusion des antibiotiques sur gélose ou méthode des disques conçue par CHABBERT en 1973.

A partir d'une culture pure et jeune de 24 heures dans un bouillon coeur-cerveau, 2 gouttes sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur puis diluées dans 10 ml d'eau physiologique à 9‰. Après homogénéisation, le contenu est déversé dans des boites de Pétri contenant 20 ml de gélose de Mueller Hinton fraîchement coulée et solidifiée. On obtient ainsi un étalement uniforme en nappe. L'excès de liquide est rejeté et la boite est mise à sécher dans l'étuve pendant 15 minutes. Ensuite, à l'aide d'un distributeur de disques, on place les disques d'antibiotique sur la gélose. Les boites sont laissées pendant 20 minutes à la température ambiante pour une bonne diffusion de l'antibiotique, puis elles sont mises à l'étuve pendant 18 heures à 37 °C.

La lecture se fait par la mesure du diamètre de l'auréole d'inhibition rapportée à une échelle étalonnée fournie par l'Institut Pasteur de Paris.

b.2. Réalisation de la conjugaison

- Principe:

Les gènes de résistance aux antibiotiques situés sur des plasmides ou le chromosome peuvent être transmis par conjugaison, transduction ou encore par transformation d'une bactérie à une autre qu'elle soit de la même espèce, d'une espèce différente ou même d'un genre bactérien différent (COURVALIN et TRIEU-CUOT, 1982; BRISSON-NOEL et coll., 1989).

Cette diffusion prend souvent un aspect épidémique "infectieux" particulièrement lorsqu'elle est favorisée par une pression de sélection (OUNISSI H., COURVALIN P. 1983).

La démonstration de la nature plasmidique d'un ou plusieurs caractères ainsi que leur caractérisation font appel à des techniques génétiques et biochimiques dont l'une consiste à transférer le plasmide dans une souche qui en est dépourvue et à vérifier la corrélation entre l'acquisition d'un ou des caractères recherchés et l'antibiotype initial. Le transfert d'un plasmide d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice peut se faire aussi par conjugaison. La technique a été décrite en 1960 par WATANABE et mise au point par CHABBERT.

La conjugaison nécessite un contact intime entre cellules permettant le transfert de l'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice (SAUNDERS, 1984).

Dans notre cas, la souche sauvage est polyrésistante, mais sensible à l'acide nalidixique et la bactérie réceptrice qui est la souche K12 Nal^r est sensible aux antibiotiques mais résistante à l'acide nalidixique.

Après conjugaison, la suspension bactérienne est étalée sur un milieu de sélection qui permet de recueillir les transconjugants à la fois résistants à l'acide nalidixique et aux antibiotiques étudiés, selon le milieu sélecteur étudié.

- Technique:

Les souches à étudier sont réisolées sur gélose nutritive et 3 colonies notées a, b, c sont retenues. Ces dernières constituant les donatrices et la souche réceptrice sont ensemencées dans du bouillon coeur- cerveau et incubées en agitation à 37 °C avec contrôle de la croissance par mesure de la densité optique.

Lorsque cette densité optique atteint 0,5 pour les souches donatrices et 0,8 pour les souches réceptrices, on chauffe ces dernières à 50 °C pendant 10 minutes pour lever des phénomènes de restriction éventuels.

Le mélange est réalisé avec 2 ml de chaque souche donatrice et 8 ml de la réceptrice et réincubé à 37 °C pendant 18 heures.

Les solutions d'antibiotiques sont préparées avec de l'eau distillée stérile, à l'exception du chloramphénicol qui est d'abord dissout dans 1 ml d'alcool à 90°, puis complété à la concentration désirée avec l'eau distillée.

1°) Préparation des boîtes de sélection

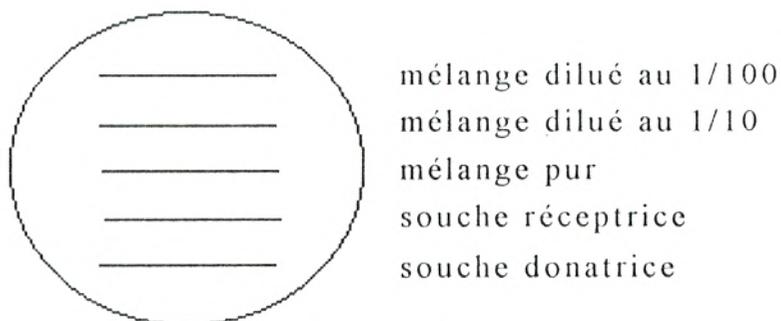
Dans chaque boîte de sélection qui contient 18 ml de milieu de Drigalski en surfusion, on ajoute 1 ml de solution d'acide nalidixique et 1 ml de l'antibiotique désiré de façon à obtenir les concentrations finales tel que l'indique le tableau suivant.

Antibiotiques	Concentration solution mère en mg/ml	Concentration finale en µg/ml
Ampicilline	400	20
Streptomycine	250	12,5
Chloramphénicol	200	10
Acide nalidixique	2000	100

2°) Ensemencement des boites de sélection

1 ml de culture mixte est dilué dans de l'eau physiologique au 1/10 puis au 1/100.

Les boites de sélection sont ensemencées de la manière suivante: à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée, plongée préalablement dans la dilution 1/100, on effectue des traits horizontaux selon le schéma suivant.



Sur ces boites de sélection, la souche donatrice et la souche réceptrice ne doivent pas se développer, les seules bactéries capables d'y croître doivent être résistantes à l'acide nalidixique et à l'antibiotique en présence.

Après 48 heures d'incubation à 37 °C, on effectue un antibiogramme sur au moins 5 transconjugants obtenus par boite de sélection éventuellement afin de déterminer les caractères transférés.

Remarque: Les résultats doivent être confirmés sur les trois colonies a, b, c sinon l'expérience est refaite

Nous avons choisi cette technique, notre but n'étant pas d'étudier les fréquences de transfert.

b.3. Caractérisation des plasmides par électrophorèse

Afin de caractériser les plasmides des souches de colibacilles isolées, nous avons sélectionné 13 souches et leurs transconjugants respectifs pour une étude par électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode de Kado et Liu (1981).

1°) Extraction de l'ADN plasmidique

Chaque clone à analyser est ensemencé en bouillon coeur-cerveau et incubé une nuit à 37 °C.

- 1,5 ml de culture bactérienne sont centrifugés à 5000 t/mn pendant 15 mn.
- Le culot est repris par 0,1 ml de tampon d'électrophorèse et 0,2 ml de solution de lyse.
- Après une agitation douce, les tubes sont placés une heure à 55 °C.
- Puis 0,6 ml de mélange phénol-chloroforme (V/V) sont ajoutés au lysat.
- Après émulsion, le mélange est centrifugé à 12000 t/mn pendant 10 mn.
- La phase supérieure est alors prélevée et conservée à 4 °C

2°) Electrophorèse en gel d'agarose à 0,7%

L'ADN est visualisé par incorporation du bromure d'éthidium à raison de 0,5 µg/ml de gel.

50 µl d'échantillon additionné de pourpre de bromocrésol, 0,25% de glycérol (à 50%) et de triacétate 50 mM pH 7,9 sont déposés dans les puits.

La migration se déroule sous une tension de 150 V pendant 5 heures.

La taille des plasmides est déterminée par référence à plusieurs marqueurs (PBR322, λ Hind III, Ψ X174) voir Tableau n° 21.

2. Résultats et discussion

a. Antibiorésistance globale

Nous avons testé toutes les souches isolées avec les 9 antibiotiques précités. Les résultats figurent dans les tableaux 12, 13, 14; ils nous révèlent tout de suite que la diversité ne touche pas seulement les chimiotypes mais aussi les antibiotypes tel que l'a déjà noté CHIKHI dans une ferme d'élevage en Normandie et comme le montre le Tableau n° 12.

Il en ressort tout de suite, une nette prédominance des souches résistantes (460) par rapport aux souches sensibles (60), soit 88,46 contre 11,54%. D'ores et déjà, ce chiffre paraît impressionnant. Il l'est encore plus lorsqu'on constate que le nombre de souches résistantes à 6 antibiotiques et plus, 98 soit 19%, est supérieur à celui des souches totalement sensibles.

Nos résultats sont comparables à ceux de CHIKHI (1978) sur le veau qui trouve que les souches résistantes forment 80% des souches étudiées dans une ferme d'élevage française, de même à ceux de TERKI-Hassaine (1991) chez le nouveau-né humain avec 82,7% au C.H.U. de Tlemcen.

Afin de mieux cerner cet aspect, examinons le comportement des souches vis à vis de chacun des antibiotiques testés.

b. Résistance vis à vis des antibiotiques testés

Pour chaque antibiotique, les résultats sont donnés dans le Tableau n° 13.

Tableau n° 12: Antibiotypes des colibacilles de tous les veaux nouveau-nés

	V ₁													V ₂							V ₃											V ₄													V ₅													V ₆												
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	h	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	b	c	d	e	f	g	h	i	j															
*Sensibles	0	4	5	4	4	1	0	7	4	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	1	0	1	0	0	2	6	0	1	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0															
A		5	2			1	1	1	3	2	1						1		2										1										2																															
T	2				1								1		1	1									1		4	5	2	3	3			3	1		3	4	2	5	9	8	7	2		1	2	1	4	5			6		1															
S	1									2																																																												
Su											4																						1																																					
C																																	1				1			1																														
N																																					1																																	
AC		2																3																		1		1																																
AT	1			1	2						9	1	1	1	1	5	1		2		10	7				1	1					1						2	3		4	8		1																										
AS	3	1				1			2	2																																																												
KN																												1								1																																		
CT																										3	2	1	3			2				1	2					1																												
ASu											1						1																																																					
TSu											1																											1																																
KT																																							1															2	2															
NT													1																																																									
AN																																																				1																		
ST																																										1																												
ASCs	1																		6	1								2								2		1							3																									
ACT				1														1														1		2										2	1										3															
KNT																			1																																																			
ATCs																																																																						
ATSu											1																																																											
NTCs																1																																																						
AKT																																																																						
ASSu																	1																																																					
ASC																																										1																												
CTSu																																																																						
ANT															1	2			1													1																							1															

Tableau n° 12 (suite): Antibiotypes des colibacilles
de tous les veaux nouveau-nés

	V ₁											V ₂							V ₃								V ₄											V ₅											V ₆									
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	h	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	b	c	d	e	f	g	h	i	j			
AKNT		2					2	1			1						4					2	3	5							1									1			2	2					1	1								
ASTSu				1									1	1				2													1																				1							
SKNT								1																									2									1																
SCTSu																																					1	2																				
ASNT												1	1			1	1																																									
ASTSu																1																																										
AKNCT																									1										1								2															
AKNTSu																																			1																							
SKNCT																																	1																									
SKNTSu			2																																																							
ASCTSu					1	1																									10									4	2	2																
ASKTSu																																																										
ASKNT												1	2																														1															
AKNTCs																																																										
ASNCT																1																																										
ASNTCs																1																																										
ASKCTSu																																											3	4	2	1												
SKNCTSu																																	1																									
ASKNCsSu						1																		1							1																											
ASKNTSu																																	1																									
ASNCTCs												1																																														
ASNTCsSu												1	1	1																																												
ASNCTSu																	2																																									
AKNCTSu																	1																																									
ASKNCT																	1																																									
ASKNCTSu						4								2	2			2	6		1	1	2	4	1	1	4	3	0	4	2				1		1	1									5	2										
ASKNTCsSu												2																			3																											
ASNCTCsSu												1																																														
ASKNCTCs												2	1																																													
ASKNCTCsSu																		1																																								

1. La tétracycline est l'antibiotique, auquel le plus grand nombre de souches de colibacilles (72,8%) sont insensibles, partiellement (21,9%) ou entièrement (50,9%), malgré son absence dans la thérapeutique.

2. En deuxième position, l'ampicilline, auquel les souches résistent à 57,1%. Ce résultat est plus faible que celui d'autres travaux chez le veau (CHKHI: 71%) et le nourrisson (TERKI-HASSAINE: 76%), mais tient tout de même une place importante du point de vue général de l'antibiorésistance. A noter que beaucoup de souches d'entérobactéries et de colibacilles en particulier sont résistantes naturellement à cet antibiotique.

3. Pour les autres antibiotiques, la proportion des souches résistantes constitue entre 6 et 35% du nombre total. 28% seulement résistent aux sulfamides alors que cet antibiotique est fréquemment utilisé en thérapeutique dans l'exploitation.

Pour les aminosides, 18% résistent à la Streptomycine, 27% à la Kanamycine et 17% à la Néomycine.

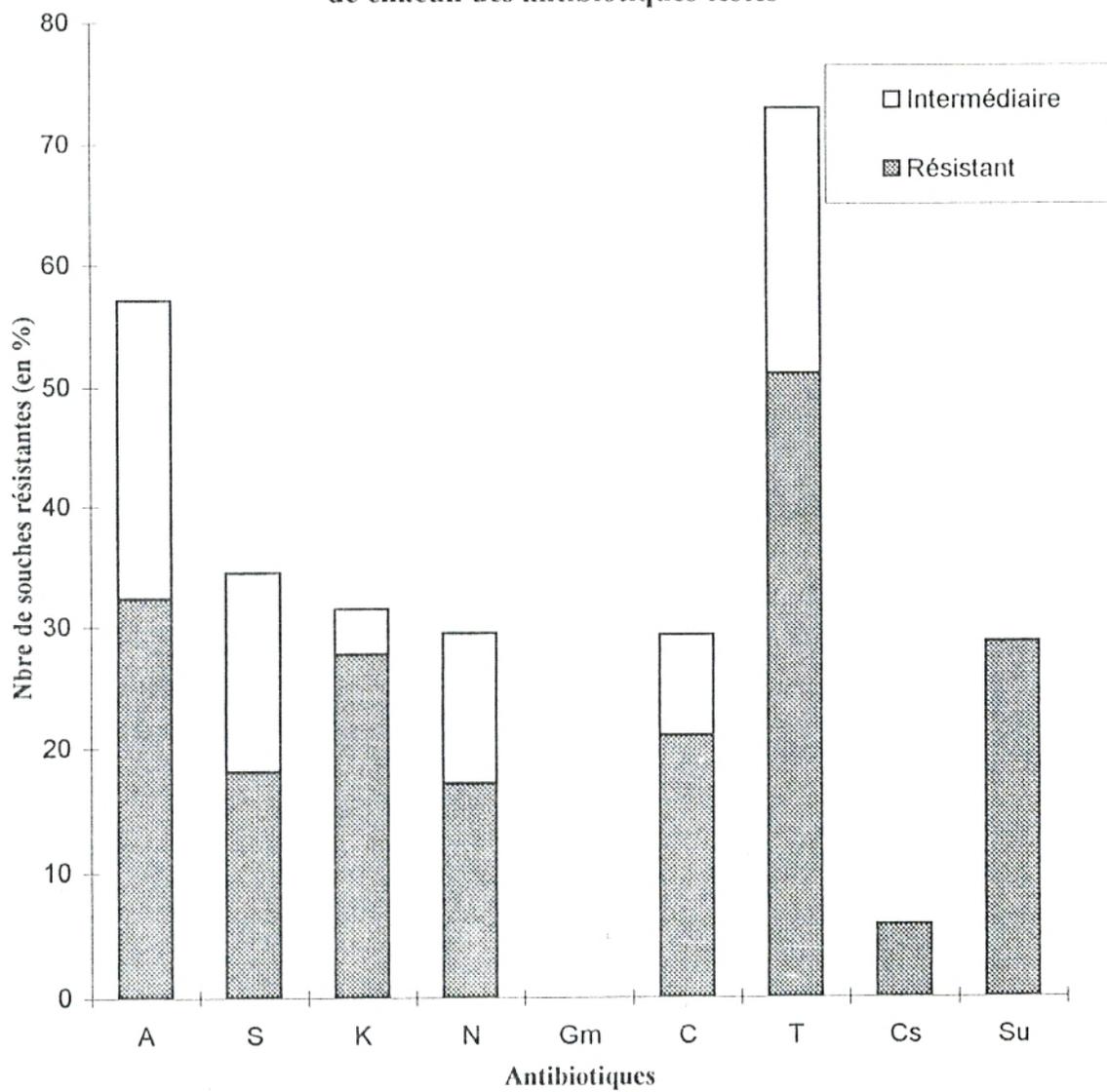
Notons que toutes les souches sont sensibles à la gentamycine alors que la résistance à ce caractère a été observée par TERKI-HASSAINE en 1991 chez le nouveau né humain en milieu hospitalier.

Ceci peut s'expliquer par l'absence de pression de sélection dans ce milieu du fait de la non utilisation de cet antibiotique par les vétérinaires en raison de son coût élevé.

**Tableau n° 13: Comportement des colibacilles
vis à vis de chaque antibiotique.**

ANTIBIOTIQUE	CONCENTRATION		INTERMEDIAIRE	RESISTANT
	EN µg/ml			
	S	I	R	
Ampicilline	4	16	129 (24,80%)	168 (32,30%)
Stréptomycine	8	12	85 (16,34%)	94 (18,10%)
Kanamycine	8	32	19 (03,70%)	144 (27,70%)
Néomycine	8	32	64 (12,30%)	89 (17,11%)
Gentamycine	4	16	0	0
Choramphénicol	8	32	43 (08,26%)	109 (21,00%)
Tétracycline	4	16	114 (21,92%)	265 (50,96%)
Colistine	2	2	0	30 (05,76%)
Sulfamides	100	350	0	149 (28,65%)

Figure n° 2: Résistance des colibacilles vis à vis de chacun des antibiotiques testés



c. Multirésistance - Les antibiotypes

Pour une étude d'environnement, les antibiotypes constituent un facteur aussi important que l'aspect biochimique des souches.

c.1. Multirésistance

Nous avons classé les antibiotiques en 9 catégories, suivant le spectre de résistance dans les Tableaux n° 12 et 14..

Il est important de remarquer que les antibiotypes A(20), T(86), AT (63), AKNT (28), ASCTSu (20), ASKNCTSu (49), c'est à dire un nombre total de 266, forment à eux seuls 51% de l'ensemble des souches.

Comme l'indiquent nos résultats, il en ressort des particularités de résistance aux antibiotiques chez un nombre important de souches avec pour conséquence des possibilités d'incidence grave en clinique.

En effet, la multirésistance est un problème grave; si son évolution et sa dissémination est rapide, elle peut devenir insurmontable avec pour conséquence, beaucoup de difficultés dans l'élaboration des schémas thérapeutiques. (SANDERS, 1991; NEU, 1992; SANDERS et SANDERS, 1992).

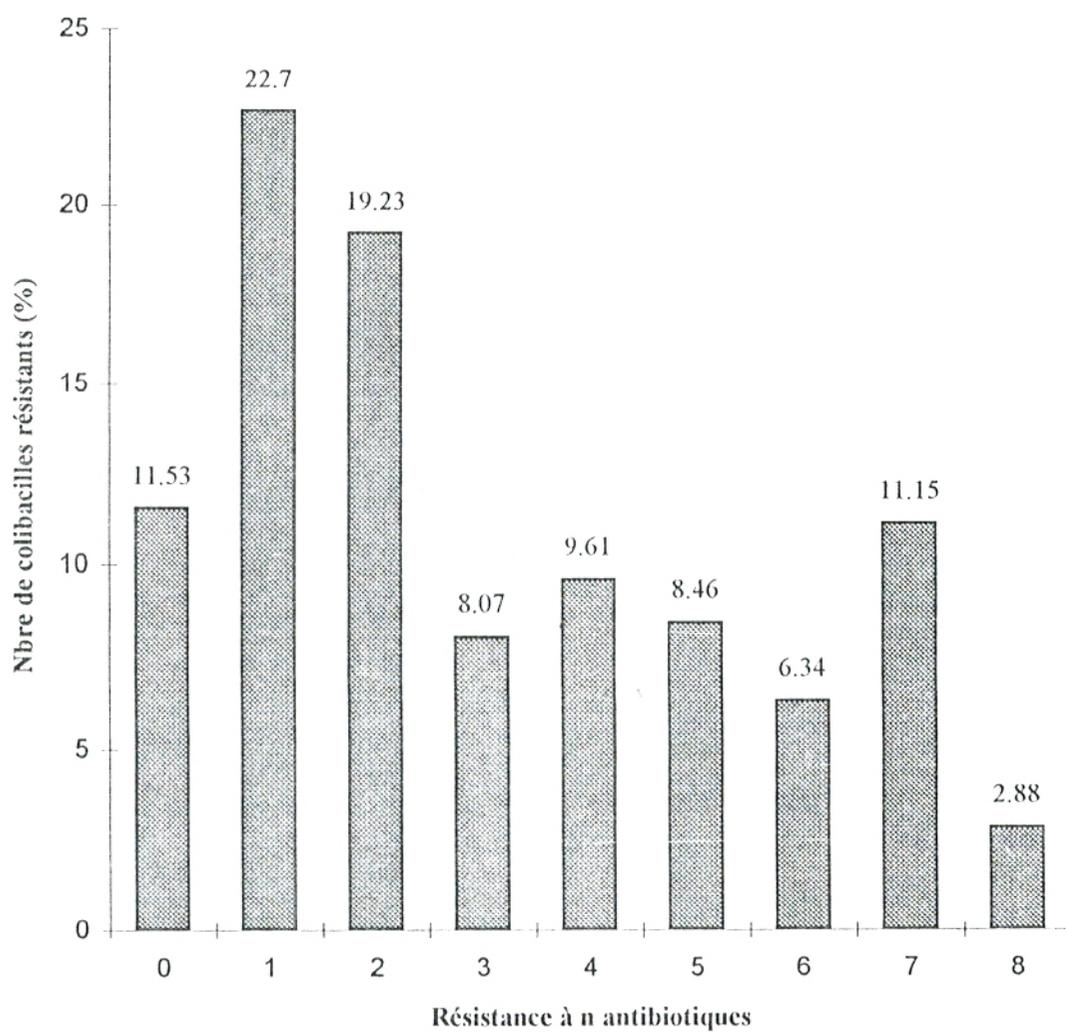
Les résistances au chloramphénicol et à la colistine sont présentes avec des pourcentages respectifs de 21% et 5,7% .

Ajoutons que nos résultats concordent avec ceux de SOUSSY et coll. en 1988, qui rapportent que parmi les 3 principales familles d'antibiotiques: β lactamines, aminosides et quinolones, c'est celle des β lactamines qui a connu les plus importants développements, puisque 35% des E. coli sont actuellement résistants aux aminopenicillines (ampicilline). Ces mêmes auteurs ont trouvé des proportions de 20% pour les sulfamides, 27% pour le chloramphenicol, plus de 40% pour la tétracycline, 37% pour la streptomycine, 13% pour la kanamycine et entre 1,6 et 2% pour la gentamycine.

**Tableau n° 14: Répartition de l'antibiorésistance
chez tous les colibacilles**

Résistance à	Nombre de colibacilles résistants N	% N / 520
Sensibles 0	60	11,53
1 ATB	118	22,70
2	100	19,23
3	42	8,07
4	50	9,61
5	44	8,46
6	33	6,34
7	58	11,15
8	15	2,88

Figure n° 3: Répartition de l'antibiorésistance chez tous les colibacilles



Pechere (1989), apporte également que plus de 90% des souches d'E. coli sont sensibles aux aminoglycosides modernes type gentamycine.

c.2. Evolution de l'antibiorésistance - Répartition des antibiotypes dans le temps

La variété des antibiotypes est aussi remarquable que celle des chimiotypes. Comme pour ces derniers, nous avons essayé de voir s'il y avait une évolution en fonction des veaux, de leur âge et de leur état physiologique.

Le Tableau n° 15, où figure l'inventaire des types de résistance pour chacun des veaux rencontrés au cours du temps, nous permet de distinguer l'existence d'un certain nombre de stades, dans l'évolution de cette résistance aux antibiotiques.

La flore de départ des prélèvements a tendance à être sensible chez la plupart des veaux.

Les résultats de l'évolution dans le temps de l'antibiorésistance pour chacun des veaux nous montrent clairement la diminution des souches sensibles jusqu'au 20^{ième} jour puis une remontée de la sensibilité à partir de la quatrième semaine. En effet, chez les veaux V₁, V₄, V₅, les proportions des souches résistantes à 4 antibiotiques et plus augmentent jusqu'au 20^{ième} jour environ, puis diminuent à partir de la quatrième semaine.

Il faut signaler cependant chez les veaux V₂ et V₃ qui ont présenté quelques épisodes de diarrhée, les souches multirésistantes apparaissent dès les premières heures de la colonisation et persistent en proportions importantes.

Ces résultats expérimentaux confirment la précocité d'implantation des E. coli sensibles et résistants, ainsi que la fréquence et la variété des souches multirésistantes rencontrées préférentiellement dans les élevages où conduite d'élevage et hygiène laissaient à désirer (GUILLOT et coll., 1983; HINTON, 1986).

Tableau n° 15: Résistance à un ou plusieurs antibiotiques pour chacun des veaux en fonction de leur âge

Veau Résistance à	V ₁					V ₂				V ₃			V ₄				V ₅				V ₆				Totaux																	
	0-24h	2j	3-7j	7-20j	20j-+	2j	3-7j	7-20j	2j	3-7j	7-20j	2j	3-7j	7-20j	20j-+	2j	3-7j	7-20j	20j-+	2j	3-7j	7-20j	20j-+	2j		3-7j	7-20j	20j-+														
	a	b	c	def	ghij	k	l	b	cde	f*	g*	a	bcde	f*	g*	h*	b	c	def	g*	h	j	k	b	c	def	g	h	i	j	k	b	c	de*	f	g	h	i	j			
0	0	4	5	441	0744	0	1	0	000	0	0	0	0000	0	2	0	1	1	01	0	0	2	6	0	1	2	300	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	60
1 ATB	3	3	2	011	1134	1	4	0	100	1	2	0	2000	0	1	0	4	5	233	0	0	2	3	1	4	5	469	8	7	2	0	2	2	1	4	3	0	0	6	0	1	118
2	4	3	0	011	2022	9	3	1	110	5	2	2	3007	7	0	0	3	2	311	0	0	0	0	3	2	3	131	0	3	1	0	3	7	1	0	2	0	0	0	2	2	100
3	1	0	0	010	0100	0	1	0	011	3	0	7	2000	0	0	0	0	0	301	0	0	0	0	2	2	0	110	0	0	0	2	5	0	0	0	3	0	0	0	4	0	42
4	0	0	0	210	2110	0	1	0	221	1	5	0	1002	2	3	6	0	0	001	0	2	0	0	2	0	0	000	0	0	0	2	0	0	3	2	1	0	0	0	3	1	50
5	0	0	0	221	0000	0	0	1	220	0	1	1	0000	0	0	0	0	0	000	1000	0	1	1	0	1	0	100	0	0	6	4	0	1	4	0	1	0	2	0	1	44	
6	0	0	0	000	1000	0	0	2	224	0	0	0	0000	0	1	0	0	0	020	0	1	0	1	1	0	0	000	0	0	0	1	0	0	0	3	0	5	6	0	0	1	33
7	0	0	0	000	4000	0	0	5	122	0	0	0	2601	1	2	4	0	1	143	0	7	2	0	0	0	0	000	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0	58
8	0	0	0	000	0000	0	0	0	100	0	0	0	04010	0	0	0	0	0	000	0	0	0	0	0	0	0	000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
																																									520	

88

* diarrhée (signes)

* traitement

Chez le veau V₆, qui n'a pas présenté de signes de diarrhée, la flore est résistante en forte proportion jusqu'à la 4^{ème} semaine. Ceci peut s'expliquer par la pression de sélection due aux traitements par les sulfamides qu'ont subi les animaux à la fin de la première semaine. Ces observations rejoignent celles de DUCLUZEAU (1988) qui apporte que les antibiotiques jouent essentiellement le rôle de facteurs de sélection entraînant l'émergence de bactéries résistantes.

c.3. Aspect biochimique et antibiorésistance

La similitude dans le comportement de ces deux aspects, nous amène à faire une comparaison entre eux, afin de voir s'il existe une corrélation entre la dominance d'une part et l'hétérogénéité d'autre part.

Sur le Tableau n° 16, nous avons fait figurer les 4 chimiotypes dominants avec leurs antibiogrammes. Il apparaît clairement que ces chimiotypes dominants, rencontrés fréquemment chez les veaux, sont la source d'une forte antibiorésistance.

C'est parmi le type 5144572, que l'on compte le plus de colibacilles du type A, AT, ASKNCTSu, ASKNCTCsSu au moment de la phase diarrhéique.

De même pour le type 5044572 qui renferme le plus de colibacilles: ASCTSu, ASKNTSu et ASKCTSu, incriminé aussi dans la colibacillose. (CHIKHI, 1978).

L'antibiorésistance ne fait que favoriser la dominance du type 5144572 mais ne l'explique pas.

35% des souches appartenant à 5144572 sont résistantes à 6 antibiotiques et plus. Les souches appartenant aux trois autres types dominants forment ensemble 19,7% seulement des résistances à 6 antibiotiques et plus. Signalons quand même l'importance des résistances à 5 antibiotiques pour les souches 5044572 avec 50%.

Tableau n° 16: Antibiotypes des colibacilles dominants.

CHIMIOTYPES ANTIBIOTYPES	5144572	5144552	5044552	5044572	N/T
Sensibles	15	11	10	0	36/60
A	7	5	3	1	16/20
T	15	18	18	4	55/86
S	0	2	1	0	3/3
Su	3	1	0	0	4/5
C	0	0	1	0	1/3
N	1	0	0	0	1/1
AC	3	2	0	2	7/7
AT	18	18	6	4	46/63
CT	1	8	1	1	11/15
ASu	1	0	0	0	1/2
Tsu	1	1	0	0	2/2
KT	0	3	2	0	5/5
NT	0	0	0	0	0/1
AN	0	0	0	0	0/1
ST	0	1	0	0	1/1
AS	5	0	0	0	5/9
KN	0	0	1	0	
ASCs	0	0	0	0	0/1
AST	1	0	0	0	
ACT	2	7	4	3	16/17
ASC	0	1	0	0	1/1
ATCs	0	0	1	0	1/1
SKT	0	0	2	0	
KNT	1	1	0	0	2/11
ATSu	0	1	0	0	1/1
NTCs	0	1	0	0	1/1
AKT	0	1	1	0	2/2
ASSu	1	0	0	0	1/1
CTSu	0	1	1	0	1/1
ANT	5	0	0	0	5/5

Tableau n° 16 (suite): Antibiotypes des colibacilles dominants.

CHIMIOTYPES ANTIBIOTYPES	5144572	5144552	5044552	5044572	N/T
AKNT	22	3	2	1	28/28
ASTSu	1	0	2	0	3/7
ANTSu	0	1	0	0	9/1
SKNT	3	1	1	0	4/4
SCTSu	1	0	0	1	2/4
ASNT	2	0	1	0	3/4
AKNCT	1	0	1	2	1/1
AKNTSu	1	0	0	0	1/1
SKNCT	0	0	0	0	0/1
SKCTSu	1	0	0	0	1/1
SKNTSu	0	2	0	0	2/3
ASCTSu	6	1	0	18	25/25
ASKTSu	0	0	0	2	2/2
AKNTCs	1	0	0	0	1/2
ASNCT	0	0	0	0	0/1
ASNTCs	0	0	0	1	1/1
ASKNT	0	1	2	1	4/4
ASKCTSu	9	1	2	3	15/15
SKNCTSu	0	0	1	1	2/2
ASKNCSu	2	1	0	0	3/4
ASKNTSu	0	1	0	4	5/10
ASNCTCs	1	0	0	0	1/1
ASNTCsSu	1	0	1	0	2/3
ASNCTSu	3	0	0	0	3/3
AKNCTSu	1	0	0	0	1/1
ASKNCT	1	0	0	0	1/1
ASKNCTSu	42	5	0	1	48/48
ASKNCTCs	0	1	1	0	2/2
ASKNTCsSu	1	0	0	0	1/2
ASKNCTCsSu	12	2	1	0	15/15
TOTAL: 58 ANTIBIOTYPES	193	103	67	51	

Dans certains cas, le fait qu'il existe des chimiotypes différents portant les mêmes antibiotypes laisse déjà se profiler la perspective du transfert *in vivo* (CHIKHI, 1978).

Enfin, l'hétérogénéité s'amortit avec l'âge puisque, d'un côté le nombre de chimiotypes se réduit, de l'autre, les souches deviennent sensibles ou peu antibiorésistantes.

d. Résultats et discussion

Le transfert a été effectué sur 27 souches multirésistantes à 4 antibiotiques et plus; 3 d'entre elles étaient productrices de colicines tel que l'indique le Tableau n° 17.

24 d'entre elles ont transféré au moins un caractère, la résistance à l'ampicilline, et jusqu'à 6 caractères en bloc ASKNTSu ou ASKNTcol+

Les séquences transférées laissent penser que cette antibiorésistance est véhiculée par plusieurs plasmides puisque le caractère ampicilline peut être retrouvé seul, avec la tétracycline AT (14 fois), ou avec d'autres marqueurs.

On remarquera que tous les marqueurs sont susceptibles d'être transférés. Celui de la colistine n'est pas passé, ce qui pourrait être en faveur d'une localisation chromosomique.

On notera également le passage du facteur col à partir des 3 souches productrices ($V_5 i_1$, $V_4 g_5$, $V_4 j_8$), ce qui confirme son support plasmidique tel que l'ont déjà observé MILCH en 1984, KISSEL et coll. en 1990, d'où l'éventuel passage de facteurs de virulence portés sur les mêmes structures.

Ainsi, dans la plupart des cas, on a constaté que le support génétique de ces mécanismes de résistance est extrachromosomique et même transférable; ce qui est indicateur de risque de dissémination de ces phénotypes dans le monde bactérien (POHL et coll., 1977; SANDERS et SANDERS, 1992; NEU, 1992).

**Tableau n° 17: Détermination des caractères transférés
chez 27 souches de colibacilles.**

Chimiotypes	Souche n°	Antibiotypes	Caractères transférés (AM)
5144552	V1 d ₈	ASKNTSu	AKT
5144572	V2 g ₆	AKNTCs	AT
5144572	V2 b ₈	ASKNTCsSu	AT (2) AKNT (8)
5044552	V2 c ₈	ASKNT	AT
5144572	V3 c ₃	ASKNCTCsSu	AT
5144572	V3 h ₃	AKNT	AT
5144572	V3 h ₄	ASKNCTSu	ASKNTSu
5144572	V4 c ₁	ASKNCTSu	0
5144572	V4 c ₁₀	ASKNCTSu	AT
5144572	V4 e ₁	ASKNCTSu	0
5144572	V4 e ₇	ASKNCTSu	AT
5144572	V4 d ₂	ASKNCTSu	ASTSu
5144572	V4 e ₈	ASKNCTSu	ASNTSu
5044572	V4 g ₅	ASCTSu Col ⁺	AST, Col ⁺ , ColV
5144552	V4 j ₈	ASKNTSu Col ⁺	ASKT, Col ⁺
5144572	V4 k ₁	ASKCT	AT
5144572	V5 i ₁	ASKNCTSu Col ⁺	ASKT, Col ⁺
5044572	V5 i ₂	ASCTSu	AT
5044572	V5 i ₅	ASCTSu	AT
5044572	V6 b ₂	ASCTSu	AT
5144572	V6 c ₇	ASCTSu	AT
5144572	V6 d ₁	AKNT	0
5144572	V6 f ₄	ASKCTSu	A
5144572	V6 f ₅	ASKCTSu	A
5144572	V6 f ₁₀	ASKNCTSu	ASNTSu
5144572	V6 g ₁	ASKCTSu	AT
5144572	V6 g ₈	ASCTSu	AT

0: pas de transfert

La mise en évidence de cette diversité de types enzymatiques de résistance et la possibilité de leur médiation par un support extrachromosomique mobile dénotent du grand pouvoir d'adaptation des bactéries à l'environnement (POHL et coll., 1977; POHL et coll., 1987; BRISSON-NOEL, 1988).

La sélection des souches multirésistantes est la résultante d'une utilisation excessive et/ou déséquilibrée des antibiotiques (SUTHERLAND in Jucker, 1994).

De plus, du fait d'un support génétique commun, la sélection de la résistance aux antibiotiques peut entraîner l'exacerbation d'autres phénotypes, tels que ceux liés à la virulence et la pathogénicité (EVANS et coll., 1975; ELWELL et coll., 1980; POHL et coll., 1987).

Ainsi, nous pouvons avoir une évolution de paire de la virulence et la résistance aux antibiotiques, situation très préjudiciable pour la santé de l'homme et de l'animal (NEU, 1992; OLUKOYA et coll., 1993; DEPAOLA et coll., 1995).

e. Résultats de la caractérisation des plasmides

Le contenu de 13 souches de colibacilles ayant transféré des caractères a été analysé par électrophorèse, de même que celui des transconjugants qui en étaient issus.

La taille des plasmides visualisés a été estimée par rapport à des marqueurs de poids moléculaire connus.

L'examen des trois photos obtenues et du Tableau récapitulatif n° 18 dressé, nous permettent de faire les observations suivantes:

- Les profils de toutes les souches et de leurs transconjugants présentent au moins une bande correspondant à 1 plasmide, ceci en excluant la bande large de l'ADN chromosomique. Certains profils, comme celui de la souche V₄ c₁₀ semble présenter 4 plasmides et 3 pour V₆ f₅.

Tableau n° 18: Caractérisation des plasmides

Souche n°	Type	Code	Nbre de plasmides probable	Poids moléculaire Kb	Antibiotypes	Caractères transférés	
Marqueurs	PBR 322	R ₁	12	0,06 < PM < 0,6			Photo 1
	λ Hind III	R ₂	7	0,6 < PM < 24			
	Ψ X174	R ₃	10	0,07 < PM < 2			
V _{4j8}	Sauvage Transconjugant	1	1	> 30 Kb	ASKNTSu col	ASKNT col	
		2	1 ou 2	"	ASKNT		
V _{5i2}	Sauv. T.C.	3	2	"	ASCTSu	AT	
		4	2		AT		
V _{6f5}	Sauv. T.C.	5	3	"	ASKCTSu	A	
		6	2		Λ		
V _{1d8}	Sauv. T.C.	7	2	"	ASKNTSu	AKT	
		8	2		AKT		
V _{2c8}	Sauv. T.C.	9	2	"	ASKNT	AT	
		10	1		AT		
V _{5i1}	Sauv. T.C. T.C.	11	2	"	ASKNCTSu col	ASKT col	
		12	1		ASKT col+		
		13	1		ASKT col+		
V _{5i5}	Sauv. T.C. T.Cu	14	2	"	ASCTSu	ASTCSu	
		15	1		ASTCSu		
		16	1		Λ		
V _{6g8}	Sauv. Sauv. T.C. T.C. T.C.	17	1	"	ASCTSu	AT	
		18	1		ASCTSu		
		19	*		AT		
		20	1		AT		
		21	1		AT		
V _{3c3}	Sauv. T.C. T.C. T.C. T.Cu	22	2	"	ASKNCTCsSu	AT	
		23	1		AT		
		24	1		AT		
		25	1		AT		
		26	0				
V _{6g1}	Sauv.	27	2	1 > 30 Kb 1 < 23 Kb	ASKCTSu		
V _{5i2}	Sauv.	28	2	1 > 30 Kb 1 < 23 Kb	ASCTSu		
V _{4k1}	Sauv. T.C. T.C.	29	3	2 > 30 Kb	ASKCT	AT	
		30	1	1 < 30 Kb	AT		
		31	Rien	1 > 30 Kb	AT		
V _{6c7}	Sauv. Sauv. T.C. T.C.	32	1	> 30 Kb	ASCTSu	AT	
		33	1				
		34	1		AT		
		35	1		AT		
V _{4c10}	Sauv. Sauv. T.C.	36	4	3 > 30 Kb 1 < 23 Kb	ASKNCTSu	AT	
		37	4	3 > 30 Kb 1 < 23 Kb			
			Non Réalisé				AT

* aucune structure visible

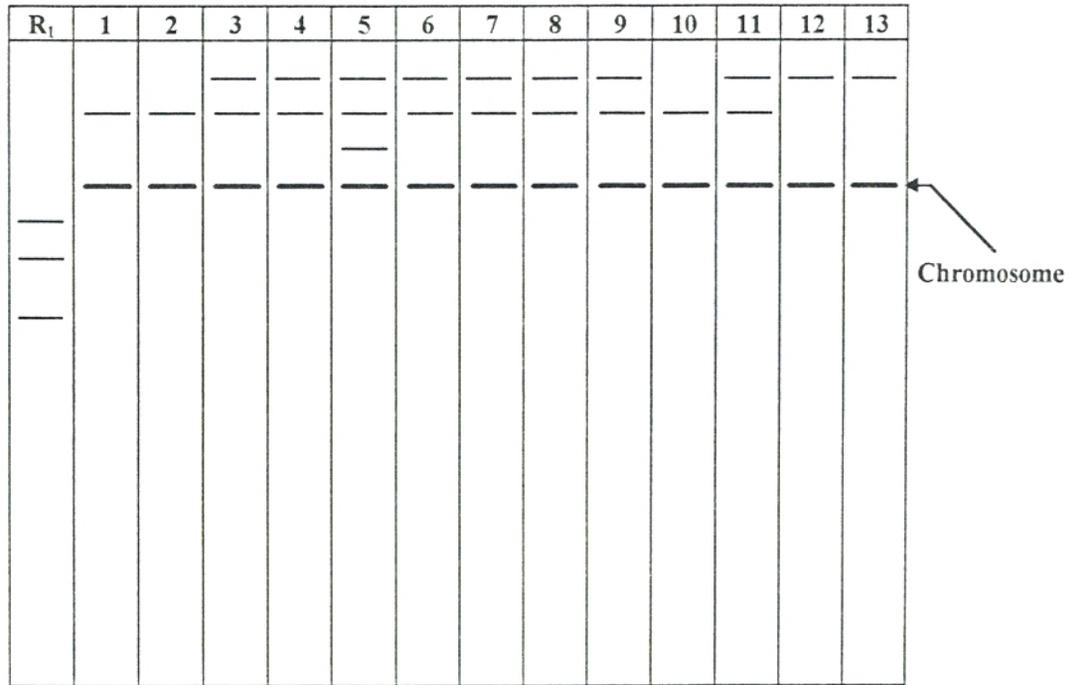


Photo n° 1

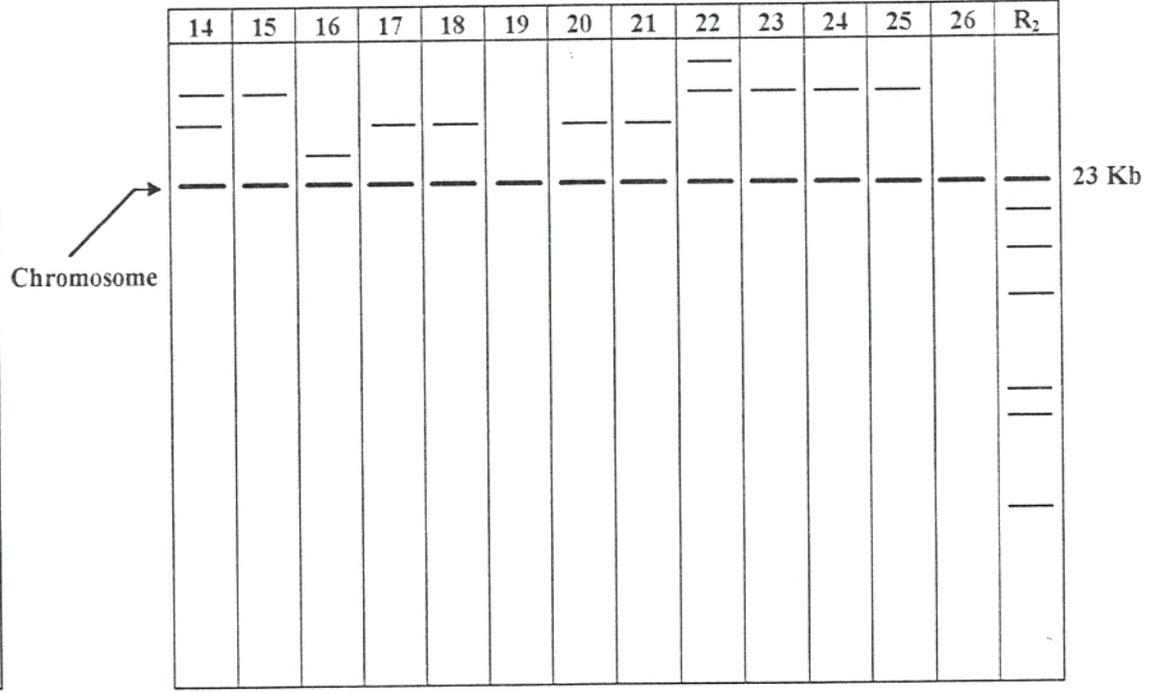
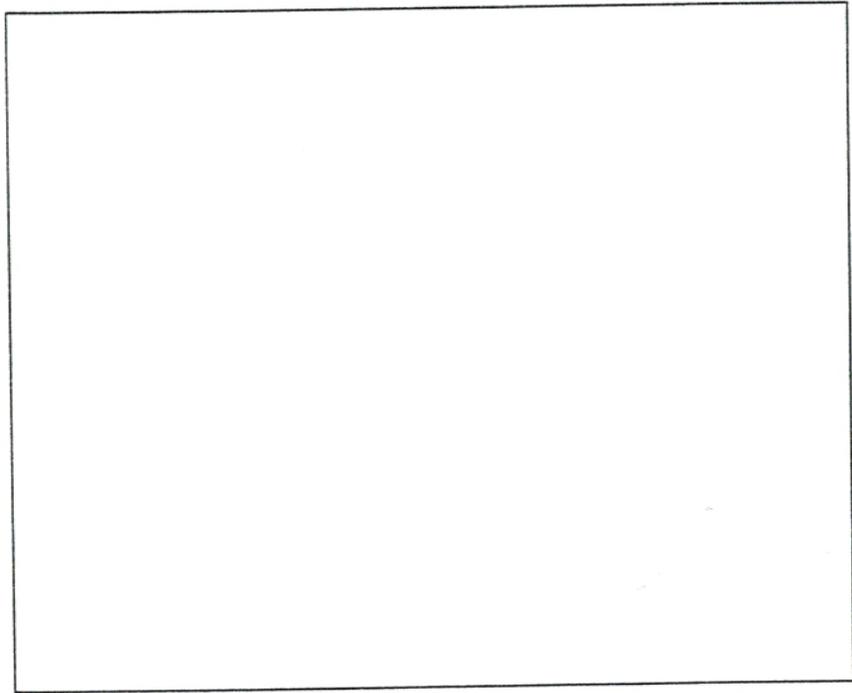


Photo n° 2

27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	R ₂
—		—			—	—	—	—	—	—	
	—								—	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—		—							—	—	

Chromosome

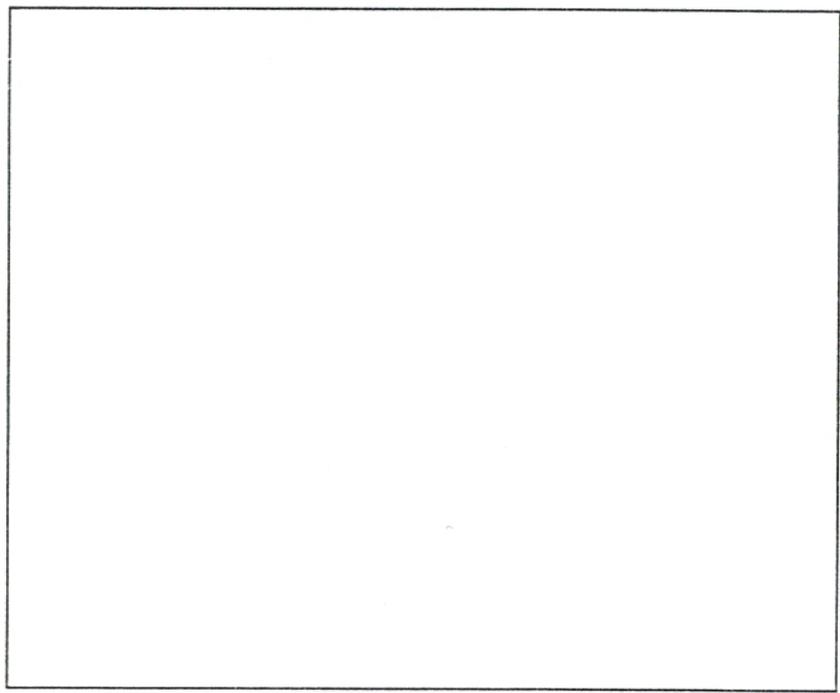


Photo n° 3

La moyenne pour la majorité des souches est de 2 plasmides.

- Le poids moléculaire de ces plasmides n'a pas été déterminé avec précision, mais il semble varier de 100 Kb à moins de 23 Kb.
- Il est également difficile de préjuger de leur fonction exacte et de leur aptitude à porter tous les caractères transférés.
- Ainsi, pour la souche V₅ i₂ ayant l'antibiotype ASCTSu et son transconjugant AT, il semble exister 2 plasmides pour chacune d'entre elles d'un poids moléculaire supérieur à 30 Kb.

Pour la souche V₅ i₁ (ASKNCTSu col+) et ses deux transconjugants ASKT col+, on observe respectivement 2 et un plasmide, ce qui laisserait supposer que ce dernier serait porteur des caractères ASKT col+ et les caractères NCSu par le second, mais il faut se garder de se prononcer trop rapidement sur des photos dont la qualité ne reflète pas celle des gels obtenus.

D'autre part, la mise en évidence des gros plasmides, généralement support des marqueurs de virulence et des facteurs colicine nécessitent des adaptations dans la technique d'extraction, notamment des volumes importants de culture, des gels à pourcentage réduit en agarose et des temps de migration plus long.

Toutefois, par comparaison aux résultats obtenus à partir des colibacilles des nourrissons du C.H.U. de Tlemcen par TERKI-HASSAINE en 1991, il semble que chez ceux du veau nouveau-né, le nombre de plasmides soit plus restreint de 1 à 4 au lieu de 2 à 8 avec une moyenne de 4 à 5.

Chez ces souches, on avait remarqué des séquences communes transférables telles que A ou AT mais différentes pour les autres.

La résistance au chloramphénicol était transférable isolément mais non celle à la néomycine, aux Sulfamides et à la Kanamycine. Ceci témoigne de 2 environnements très différents, avec des pressions de sélection très différentes, ce qui se répercute obligatoirement sur les plasmides sélectionnés même si les phénotypes ont tendance à se ressembler pour une même espèce.

C O N C L U S I O N
G E N E R A L E

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude a permis d'étudier la flore fécale de 6 veaux nouveau-nés de 0 à 45 jours. Au total une cinquantaine de prélèvements ont été effectués, à partir desquels 520 colibacilles ont été isolés et identifiés.

L'étude de leur dynamique au cours du temps a permis d'observer en premier lieu une invasion massive de l'ordre de 1 à 3 milliards de germes par gramme de fèces vers la 20^e heure, puis une diminution à la fin de la première semaine, pour une tendance à la stabilisation vers la 2^e à la 3^e semaine en cas d'absence de diarrhée néonatale.

L'étude de leurs caractères biochimiques nous a permis de répertorier 19 chimiotypes différents, parmi lesquels 4 prédominent (79,6 %) avec en tête le 5144572 (37,1 %) ayant l'aptitude de fermenter le saccharose et possédant une lysine et une ornithine décarboxylase.

L'étude de la production de colicine V en particulier a montré que 40 % des souches avaient cette aptitude très souvent corrélée à la virulence.

L'étude de la production d'hémolysine n'a pas été significative puisque moins de 3 % des souches en sont productrices.

L'antibiorésistance de cette microflore fait ressortir une nette prédominance des souches résistantes à au moins un antibiotique avec une fréquence de 88,26 %.

Cette résistance est fréquente pour la tétracycline et l'ampicilline, mais aussi importante pour la streptomycine et les sulfamides. Nous avons noté l'absence de la résistance à la gentamycine mais une résistance à la colistine.

L'étude des antibiotypes a montré une hétérogénéité de l'antibiorésistance pendant toute la période d'étude avec son augmentation chez les veaux malades pendant les phases de traitement. De plus, les conjugaisons réalisées avec 27 souches multirésistantes ont permis de confirmer la nature extrachromosomique de cette résistance.

La caractérisation de ces plasmides effectuée sur 13 souches et leur transconjugants respectifs a permis de visualiser cette capacité de transfert par les souches sauvages dont le nombre varie de 1 à 4 et leur taille est souvent supérieure à 30 Kb. Cette étude pourrait être complétée, pour confirmer cela par une étude des groupes d'incompatibilité afin de lui donner une valeur précise en épidémiologie.

Pratiquement, tous les marqueurs de résistance sont transférables à l'exception de celui de la colistine. Les facteurs colicinogènes ont également été transmis.

Il n'est pas possible de préjuger de la fonction des plasmides révélés; mais il est à remarquer leur nombre moins élevé que chez les colibacilles isolés de nourrissons du C.H.U. de Tlemcen à la même période où l'on avait dénombré jusqu'à 8. En outre, la comparaison des séquences transférées malgré quelques analogies pour les caractères A et AT, montre des différences: les marqueurs N, K, Su, n'étaient pas transférés pour des phénotypes semblables. Ceci a tendance à prouver que les plasmides véhiculés par ces souches de colibacilles sont différents parce que issus de deux environnements soumis à des pressions de sélection différentes.

En dernier lieu, il n'est jamais trop d'insister sur la nécessité de respecter les règles d'hygiène rigoureuse dans les élevages pour limiter la contamination entre animaux et la sélection de souches à la fois pathogènes et multirésistantes.

BIBLIOGRAPHIE

- **ABHA, Gaur; RAMTEKE, PW., PATHAK, SP.; BHATTACHERJEE, J.W. (1992).** Transferable antibiotic resistance among thermotolerant coliforms from rural drinking water in India.
Epidemiology infect, 109, 113-120.

- **ALBRECHT BINDEREIF; VOLKMAR BRAUN and KLAUS HANTKE, (1982).** The cloacin receptor of col V - Bearing *Escherichia coli* is part of the Fe^{3+} aerobactin transport system.
Journal of bacteriology, p. 1472-1475.

- **BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. (1982).** Further characterization of complement resistance conferred by *Escherichia coli* by the plasmid tract of R 100 and iss of col V I-K94.
Infect. Immun., 35, 654-659.

- **BORDERON, J. C.; BORDERON, E.; CHABBERT, Y. A. (1974).** Etude quantitative de la colonisation parentérobactéries multirésistantes des enfants prématurés.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur., 125 B, 45-47.

- **BRISSON-NOEL, A; TRIEU-CUOT, P.; SANGAKOFF W.; COURVALIN P. (1989).** Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques.
Ann. biol. chim., 47, 98-101.

- **BROPHY, P. O.; CAFFREY, P. J.; COLLINS, J. D. (1977).** Sensitivity patterns of *Escherichia coli* isolated from calves during and following prophylactic chlortetracycline therapy.
Brit. Vet. J., 133, 340-345.

- **BRUNEL, A. (1991).** Role des écosystèmes bactériens maternels dans la transmission et la colonisation du tube digestif du rat nouveau-né.

Thèse de doctorat es-Sciences (Sciences naturelles). Université BLAISE PASCAL Clermont-Ferand E. 432.

- **CAVALIERI, SJ, BOHACH GA, SNYDER IS (1984).** E. coli alpha-hemolysin: characteristic and probable role in pathogenicity.

Microbiol. Rev. 48, 326-343.

- **CERF, M. (1989).** Aspect of bacterial adhesion in normal and disease gastrointestinal tract in: microbial, ecology and intestinal infections.

BERGOGNE-BEREZIN, ed, Springer-Verlag, France, Paris, 27-42.

- **CHABBERT, Y. A. (1973).** Données actuelles sur la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Extraits des actualités pharmacologiques, 26, 27-60.

- **CHAKRABORTY, T., KATHARIOU S., HACKER J. et al (1987).** Molecular analysis of bacterial cytolysins.

Rev. Infect. Dis (suppl. 5), 456-466.

- **CHERIFI, A, M. CONTREPOIS, B. PICARD, PH, GOULLET, J. DE RYCKE, J. FAIRBROTHER, and J. BARNOUIN. (1990).** Factors and markers of virulence in Escherichia coli from human septicemia.

F.E.MS Microbiology Letters 70; 279-284.

- **CHERIFI, A. (1991).** Etude du caractère clonal des souches de E.coli responsables de septicémies chez l'homme et l'animal (serogroupes O₆ et O₇₈).

Thèse de doctorat. Université BLAISE PASCAL, Clermont-Ferand. D.U. 352.

- **CHIKHI, A. (1978).** Recherche des coliformes d'une ferme d'élevage de Normandie.
Thèse de doctorat-es-Sciences. Université de Caen.

- **CLANCY, J.; SAVAGE, D. C. (1981).** Another colicin V phenotype invitro adhesion of *Escherichia coli* to mouse intestinal epithelium.
Infect. immun., 32, 343-352.

- **CONTREPOIS, M.; GOUET, Ph. (1973).** La microflore du tube digestif du jeune veau préruminant: dénombrement de quelques groupes bactériens à différents niveaux du tube digestif.
Ann. Rech. Vet., 4, 161-170.

- **CONTREPOIS, M.; GOUET, Ph. (1977).** La flore normale et pathogène du veau de moins de 15 jours.
L'aliment et la vie., 65, 60-75.

- **CONTREPOIS, M.; MOHAMED OUSSAID, A.; DER VARTANIAN, M.; GIRARDEAU, J.P. (1986).** Facteurs impliqués dans la virulence des colibacilles responsables de septicémies chez le veau.
Revue de l'institut Pasteur de Lyon., 19, n°12, 141-148.

- **CONTREPOIS, M. (1988).** Les colibacilles pathogènes: adhérence et facteurs de colonisation des colibacilles enterotoxinogènes.
Symp. Int. L'intestin grêle; physiologie, physiopathologie et pathologie. Excerpta Medica., 139-150.

- **COURVALIN, P.; TRIEUT-CUOT, P. (1982).** Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques.
Inst. Pasteur, 25-28. Paris.

- **COURVALIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, J. (1985).** L'antibiogramme.
Ed. mpc-vidéom, 1^{ère} édit., Paris, 344 p.

- **DARDILLAT, C.; CONTREPOIS, M.; GOUET, Ph.; RIOU, Y. (1977).** Enregistrement chronique de la motricité gastrointestinale chez le veau axénique ou oligoxénique.
Sci. Tech. Anim. Lab., 2, 120-131.

- **DEPAOLA, A; PEELER, JT; RODRICK, GE; (1995).** Effet of oxytetracycline-mediated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds.
Applied and environmental microbiology; 61, n°6; p. 2335-2340.

- **DEBROY C; BRIGHT, BD.; WILSON, RA.; YEALY, J.; KUMAR, R.; FBHAN, MK. (1994).** Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for the identification of enteroaggregative Escherichia-coli.
Journal of medical microbiology; vol 41, n°6; pp 393-398.

- **DE RYCKE, J.; GUILLOT, JF.; BOIVIN, R. (1987).** Cytotoxins in non enterotoxigenic strains of E. coli isolated from feces of diarrheic calves.
Vet. Microbiol, 15, 137-150.

- **DE RYCKE, J. (1991).** Les colibacilles producteurs de cytotoxines. Importance en médecine vétérinaire et en santé publique.
Ann. Rech. Vet, 22,105-126.

- **DUCLUZEAU, R.; RAIBAUD, P. (1979).** L'écologie microbienne du tube digestif.
Actualités scientifiques et agronomiques de l'INRA. Masson Edit., Paris, 9p.

- **ELWELL, LP.; PL. SHIPLEY (1980).** Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals.
Annu. Rev. Microbiol., 34; 465-496.

- **ESCOULA, L.; MACOMBE, C.; COSTE, M.; FERRIE, M. (1984).** In-fluence des traitements prophylactiques sur l'évolu-tion de l'antibiorésistance des colibacilles chez le veau.
Rev. Med. Vet., 135, 77-85.

- **EVANS, DG.; RP. SILVER; DJ. EVANS; DG. CHASE; S.L. GORBACH (1975).** Plasmid contolled colonization factor associated with virulence in E. coli enterotoxigenic for humans.
Infect. Immun., 12, 656-667.

- **FREDERICQ, P. (1957).** Colicins.
Annu. Rev. Microbiol., 11, 7-22.

- **FREYMUTH, F.; PUJOL, M.; PERIGNON, M.; MOREL, C. (1971).** Etat local de la résistance aux antibiotiques.
Med. Caen. n°1, 19-37.

- **GARCIA, E.; BERGMANS, HEN; VAN DEN BOSCH, JF.; ORSKOV, I.; VAN DER ZEIJST BAM; GAASTRA, W. (1988).** Isolation and characterization of dog wopathogenic E. coli strains and their fimbriae.
J. Microbiol. 54, 149-163.

- **GERMANI, Y.; CHAPALAIN, J.C.; POCHEMALIKYG; DEGENNEP; BRETHES, B. (1985).** Etude épidémiologique sur les ECET et ECEP isolés de diarrhées infantiles à Wallis et Futuma. (Territoire Français d'outre mer).
Bull. soc. Path., 78, 141-149.

- **GOUET, Ph.; CONTREPOIS, M.; DUBOURGUIER, H. C. (1980).** La microflore intestinale banale et pathogène du veau nouveau-né. Caractères propres à la microflore lactique et aux E.coli entéropathogènes.

BULL. GTV, n°4, 35-45.

- **GRATIA, A. (1925).** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacilles.

CR. Soc. Biol, 93; 1041-1042.

- **GUILLOT, J. F.; LAFONT, J. P.; CHASLUS-DANCLA, E. (1983).** Antibiothérapie en médecine vétérinaire et antibiorésistance en pathologie animale.

Rec. Med. Vet., 159, 581-590.

- **GUILLOT, J. F.; LAFONT, J. P. (1983).** Antibiorésistance des E.coli du veau.

Rec. Med. Vet., 159 (3), 313-321.

- **GUILLOT, J. F.; MOULIN, G.; MAETEL, J. L. (1987).** Transmission colibacillaire vache-veau: intérêt de l'antibiorésistance comme marqueur épidémiologique.

In: actualités microbiologiques en pathologie digestive et respiratoire chez le veau. J. ESPINASSE et H. NAVETAT, eds, Sco. Fr. Buiatrie, Toulouse, 61-78.

- **GUTH, BEC.; AGUTAR, E.G.; GRIFFIN, P.M.; TESTA, D.A.; RAMOS, SR.; GOMES, TAT. (1994).** Prevalence of colonization factor antigens (CFAS) and adherence to hela cells in enterotoxigenic E. coli isolated from féccès of children in Sao Paulo.

Microbiology and immunology; vol. 38; n° 9; pp 695-701.

- **HACKER, J.; HUGHES, C (1985).** Genetics of E.coli hemolysin.
Curr Top Microbiol. Immunol, 118; 139-162.

- **HINTON (M) (1986).** The ecology of E.coli in animals including man with particular reference to drug resistance.
Vet. Rec., 1986, 420-426.

- **JALLAT, C.; DARFEUILLE- MICHAUD; RICH, C.; JOLY, B (1994).** Survey of climal isolated of diarrhoeogenic Escherichia coli; diffusly ad hering E.coli strains with multiple adhesive factors.
Research in microbiology; vol 145; n° 8; p 621-632.

- **JACKSON, G. (1981).** A survey of antibiotic resistance of E. coli isolated from farm animals in Great Britain from 1971 to 1977.
Vet. Rec., 108, 325-328.

- **KADO, C. I. et LIU, S. T. (1981).**
J. Bact., 145, p 1305-1373.

- **KAREN, P.; SCOTT and H.J. FLINT (1995).** Transfer of plasmids between strains of Escherichia coli under rumen conditions.
Journal of applied Bacteriology, 78, 189-193.

- **KISSEL VINCENT, HERMYLIOR and FELIP C. CARBELLO (1990).** Virulence - Related genes in ColV Plasmids of E. coli isolated from human blood and intestines.
Journal of Cl. Micr., Apr 1990 p. 742-760.

- **KORHONEN, T. K.; VALTONEN, M. V.; PARKKINENS; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. (1985).** Serotypes, hemolysin production and receptor recognition of Escherichia coli. Strains associated with neonatal sepsis and meningitis.
Infect. Immun, 48, 486-491.

- **KUDVA, I.T.; HATFIELD, P.G.; HOVDE, C.J. (1995).** Effect of diet on the shedding of Escherichia coli O 157: H7 on a sheep model.
Applied and environmental microbiology; 61 n° 4; 1363-1370.

- **KURTZ, H.J.; SHORT, E.C. (1976).** Pathogenesis of edema disease in swine: pathologic effects of hemolysin, autolysate and endotoxin of E. coli (O141).
Am J. Vet. Res, 37, 15-24.

- **LAFONT, J. P. (1984).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Essai d'actualisation.
21^{ième} colloque Soc. Fr. Buiatrie et CTV Moulins, Allier, 25 Novembre, 9-20.

- **LAMBERT; ZECHOWSKY, M.; BINGEN, E.; PROUX, M. G.:** Antibiothérapie et écologie microbienne.
Revue Med. 1980, 28, 1363-1369.

- **LEECE, J.B.; BALSBAUGH, R.K.; CLARE, D.A.; KING, M.W. (1982).** Rotavirus and hemolytic enteropathogenic E. coli in weaning diarrhea of pigs.
J. Clin. Microbiol., 16, 715-723.

- **LEMINOR, L. (1974).** Rôle de certains plasmides dans le déterminisme du pouvoir entéropathogène des E.coli.
Arch. Franç. Pedi., 31, 705-716.

- **LEMINOR, L.; VERON, M. (1984).** Bactériologie médicale.
2^{ième} édition. Flammarion. Medecine Sciences. Paris.

- **MARTEL, J. L.; CONTREPOIS, M.; DUBOURGUIER, H. C.; GIRARDEAU, J. P.; GOUET, Ph.; BORDAS, C.; HAYERS, F.; RAMISSE, J.; SENDRAL, R. (1981).** Fréquence de l'antigène K 99 et antibiorésistance chez E.coli d'origine bovine en France.

Ann. Rech. Vet., 12, 253-257.

- **MARTEL, J. L. (1986).** Ecopathologie des entérobactéries du veaux. Importance de l'antibiorésistance.

Thèse de doctorat d'état es-sciences. Université Claude Bernard, Lyon. 86-42.

- **MICHEL-BRIAND, Y. (1977).** Résistance extrachromosomique de la flore bactérienne intestinale aux antibiotiques.

Nouvelle presse médicale, 6, n°41.

- **MILCH (1984).** E.coli col. V plasmid and their role in pathogenicity.

Acta. Microbiol. Hungaria, 31, 117-125.

- **MOHAMED OUSSAID, A. (1988).** Virulence factors and markers E.coli from calves with bacteremia.

Ann. J. Vet. Rev., 49, 1657-1660.

- **MOHAMED OUSSAID, A.; CONTREPOIS, M.; DER VARTANIAN, M.; GIRARDEAU, JP. (1994).** Facteurs et marqueurs de virulence de souches Escherichia coli isolées de diarrhées chez des veaux âgés de 4 à 45 jours en Algérie.

- **MOULIN, (G.); MARTEL (J.L.); GUILLOT (J.F.).** Relations mère-veau dans le cas des infections à E. coli entéropathogènes.

In « Plasmidologie et antibiothérapie chez les bovins ». J. Espinasse, H. Navetat Soc. Fr. Bimédecine, Maisons-Alfort, 1984, 49-60.

- **NEU H.C. (1992).** The crisis in antibiotic resistance.
Science, 257, 21 August p. 1064-1073.

- **NOY, J. H.; AYLIFFE, G. A. J.; LINTON, K. B. (1974).**
Antibiotic resistant Gram negatives bacilli in the faeces of neonates.
J. Med. Microbiol., 7, 509-520.

- **OLUKOYA, D.K.; DAINI, O.A.; NIEMOGHA, M.T. (1993).**
Preliminary epidemiological studies on tetracycline resistant plasmids
isolated from enteric bacteria in Nigeria.
Tropical and geographical medicine; 45, n° 3, 117-120.

- **LOUDAR, J.; RICHARD Y.; RENAULT T.; GASTILLU, J.; et
JOUBERT, L. (1974).** Etude bactériologique de 35 souches d'E. Coli
isolées de syndrômes de lièvres d'importation, tests de
l'entéropathogénicité sur anse de lapin.
Rev. Med. Vet. 4, 449-68.

- **LOUDAR, J.; RICHARD, Y.; et EUZEBY J. B. (1977).**
Introduction à l'écologie microbienne animale.
Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon, 79, 67-72.

- **OUNISSI, H.; COURVALIN, P. (1983).** La résistance plasmidique
aux antibiotiques.
Tunisie médicale n° 6, 375-380.

- **PATTE, C.; TANCREDE, C.; RAIBAUD, P.; et DUCLUZEAU, R.
(1979).** Premières étapes de la colonisation bactérienne du tube
digestif du nouveau-né.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur 130A, 69-84.

- **PATTUS, F.; D. MASSOTTE; H.U. WILMSEN; J. LAKEY; D. TSERNOGIOU; A. TUCKER and M.W. PARKER (1990).** Colicins: procaryotic killer-pores.
Experimentia, 46, 180-194.

- **PECHER J.C. (1989).** « Bases bactériologiques de la thérapeutique antibactérienne ».
In bact. med. Ed. Flammarion.

- **POHL, P. et THOMAS, J..** Résistances multiples aux antibiotiques des colibacilles isolés des septicémies du veau en 1970 et 1971.
Ann. Med. Vet., 116, 571-577.

- **POHL, P.; THOMAS, J.; LAUB, R.; VAN ROBAEYS, G.; et MOURY, J. (1975).** Persistance d'un facteur R "in vivo" et son transfert en l'absence d'antibiotiques. Etude dans l'intestin du porc.
Med. Mal. Infect. 5, 516-519.

- **POHL, P. et THOMAS, J. (1977).** Introduction à la plasmidologie.
Ann. Med. Vet., 121, 15-25.

- **POHL, P.; THOMAS, J.; VAN ROBAEYS, G.; MOURY, J. (1977).** Résistance de flores colibacillaires en présence et en l'absence d'antibiotique. Etude dans l'intestin du porc.
Ann. Med. Vet., 121, 5, 345-349.

- **POHL, P.; THOMAS, J.; VAN MUYLEM, K. (1987).** Etude de dix souches; chez une souche seulement, un facteur R.K99 codant pour les deux types de propriétés a été isolé.
Ann. Med. Veter., 121, n° 7, 503-505.

- **POHL, P.; P. LINTERMANS (1987).** Les réservoirs de plasmides de résistance.
Journal de toxicologie clinique et expérimentale T7, n° 6; 383-397.
- **RAIBAUD, P. et DUCLUZEAU, R. (1984).** Les bactéries du tube digestif.
La recherche 151, 12-21.
- **RICHARD, Y. (1986).** Antibiorésistance et hygiène publique.
Sci. Vet. Med. Comp. 88, n° 5/6, 275-291.
- **ROBERTSON, D.C. (1988).** Pathogenesis and enterotoxins of diarrheagenic E. coli.
In: Virulence mechanisms of bacterial pathogens (Poth J, ed). ASM Washington; 241-263.
- **SANDERS C.C. (1991).** New β -lactams; New problem for the internist.
Animals of internal medicine, 115, 8, p. 650-651.
- **SANDERS C.C. and SANDERS W.E. (1992).** β -lactam resistance in Gram negative bacteria: Global trends and clinical impact.
Clinical infectious diseases, 15, p. 824-839.
- **SAUNDERS, J. R. (1984).** Genetics and evolution of antibiotic resistance.
British Medical Bulletin, 40, 54-60.
- **SINKOVICZ, Gy.; JUHASZ, B. (1974).** Development of the intestinal flora in suckling pigs.
Acta Vet. ACAD. Sci. Hung, 24, 375-381.

- **SMITH, H.W. (1963).** The haemolysins of *E. coli*.
J. Pathol. Bacteriol., 85, 197-211.

- **SMITH, H. W.; HUGGINS M. B. (1974).**
Gen. Microbiol., 92, 335.

- **SMITH, H.W.; LINGGOOD, M.A. (1971).** Observation on the pathogenic properties of the K88, HLY and ent plasmids of *E. coli* with particular reference to porcine diarrhoea.
J. Med. Microbiol., 4, 467-485.

- **SMITH, H.W.; HALLS, S. (1967).** The transmissible nature of the genetic factor in *E. coli* that controls haemolysin production.
J. Gen. Microbiol., 47, 153-161.

- **SMITH, H.W. (1974).** A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *E. coli*. The discovers of a plasmid controlled toxin and a plasmid lethal character closely associated of identical with colicin V.
J. Gen. Microbiol., 83, 95-111.

- **SMITH, H. W.; et HUGGINS, M. B. (1980).** The association of the O18K1 and H7 antigens and the col V plasmid of a strain of *Escherichia Coli* with its virulence and immunogenicity.
J. Gen. Microbiol., 121, 387-400.

- **SORIN; SONEA et PANISSET, M. (1980).** Introduction à la nouvelle bactériologie.
Presse de l'université de Montreal, 127 p.

- **SOUSSY C.; DUVAL J.; COURVALIN P. (1988).** « Résistance aux antibiotiques chez E. coli. Etats actuels et nouvelles acquisition ». Med. et Maladies infectieuses, 1, 29 à 36.
- **STIEZEL, H. (1967).** Uber den Keimgehalt des Erst mekonium bei Spontangeburt. Zbl. Gynäk, 35, 1282-1286.
- **SUTHERLAND R. (1994).** In E. Jucker. Progress in drug research, 41, p. 95-148.
Ed. Birkhauser Verlag Basel.
- **TANCREDE, C.; AZIZI, P.; RAIBAUB, P. et DUCLUZEAU, R. (1977).** Conséquences de la destruction des barrières écologiques de la flore du tube digestif par les antibiotiques. Perturbations des relations entre l'hôte et les bactéries pathogènes.
Med. Mal. Inf. 1977, 7, 145-149.
- **TERKI HASSAINE, H. (1991).** Etude des coliformes dans la microflore fécale du nouveau-né humain au niveau du C.H.U. de Tlemcen.
Thèse de Magister, Université de Tlemcen.
- **THOMAS, A.; CHEASTY, T.; CHART, H.; ROWE, B. (1994).** Isolation of vero cytotoxin - producing E. coli serotypes O9ab; H-and O101; H-carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome.
European journal of clinical microbiology & infectious diseases. Vol 13, n° 12, 1074-1076.
- **TURCK, D.; YTHIER, H.; MAQUET, E.; NEUT, C. (1984).** La flore digestive. Description et facteurs de régulation.
La médecine infantile n° 1, 53-59.

- **VALLEE E., BERGOGNE-BEREZIN E. (1989).** « Actualités du laboratoire d'antibiothérapie. Etat actuel de la résistance des bactéries aux antibiotiques ».

Revue française des laboratoires n° 184.

- **VIRGINIA L , WATERS; JORGE H. (1991).** Colicine V virulence plasmids.

Microbiol. Rev. , 55; n° 3, 437-450.

- **WATANABE, T. (1963).** Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria.

Bact. Rev., 27, 89-115.

- **WILLIAM, Ph. (1979).** Novel iron uptake system specified by Col V plasmids an important component in the virulence of invasive strains of Escherichia Coli.

Infect. Immun. 26, 925-932.

- **WRAY, C. et MORRIS J. A. (1985).** Aspects of colibacillosis in farm animals.

J. Hyg., Camb, 95, 577-593.

RESUME

L'étude a porté sur les coliformes présents dans les fèces de 6 veaux nouveau-nés d'une ferme située a Saf Saf dans la Wilaya de Tlemcen. Au total, 520 souches ont été isolées et identifiées après un suivi de 45 jours environs.

L'étude dynamique de cette microflore a montré que l'installation des coliformes se faisait aux environs de la 20^{ième} heure. L'identification a montré l'installation de la prédominance précoce d'*Escherichia coli*. Ce résultat n'exclut pas la présence à l'état sous dominant, surtout les premières heures, d'autres coliformes tels que l'ont observés d'autres auteurs comme CHIKHI en 1978 chez le veau et TERKI HASSAINE en 1991 chez le nourrisson. L'étude des chimiotypes a confirmé qu'il s'agissait d'une microflore hétérogène les premières heures avec une tendance à la stabilisation vers la fin de la première semaine.

L'étude des colicines a montré que 27% des souches produisaient des colicines dont la moitié du type colicine V.

Une hétérogénéité a été également observée pour les antibiotypes établis avec les 9 antibactériens testés. L'étude de l'antibiorésistance a révélé l'installation les premières heures d'une flore sensible pour la majorité des veaux avec l'installation progressive des souches multirésistantes jusqu'à la 3^{ième} semaine, celle-ci avait tendance à régresser après la 4^{ième} semaine. La résistance aux antibiotiques et la production des colicines sont en grande partie de nature plasmidique, puisque 24 souches sur 27 transfèrent au moins une de ces propriétés.

L'étude du contenu plasmidique par la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose, a révélé que le nombre de plasmides chez les souches étudiées pouvaient varier de 1 à 4 avec des poids moléculaires supérieurs à 30 Kb.

Ceci est différent de ce qui a été observé chez les nouveaux-nés de la maternité du C.H.U. de Tlemcen où le nombre de plasmides était de 1 à 8, avec une moyenne de 4 par souches.

Mots clefs:

Coliformes - E-coli - Flore fécale - Veau nouveau-né - Séquences de colonisation bactérienne - Chimiotype - Colicines - Antibiorésistance - Plasmides.