

PHYLOGENIE, MARQUEURS DE VIRULENCE ET ANTIBIORESISTANCE DE 87 SOUCHES DE ESCHERICHIA COLI ISOLEES DE LA VIANDE DE POULET DE CHAIR COMMERCIALISEE DANS LA WILAYA DE JIJEL (EST ALGERIE)

D. Boudjerda^a b H. Brugère^b, D. Bibbal^b and M. Lehouel^a

^aLaboratory of pharmacology and phytochemistry. University of Jijel, Algeria.

^bINSERM, UMR1043, F-31300 Toulouse, France

^dLaboratory of molecular toxicology. University of Jijel, Algeria

Laboratory of pharmacology and phytochemistry. University of Jijel, Algeria

boudjmel@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Dans le but de mener une enquête épidémiologique sur : la phylogénie, les marqueurs de la virulence et l'antibiorésistance des souches d'*Escherichia coli* commensales présentes dans les produits alimentaires, Quarante-huit (85) souches d'*Escherichia coli* ont été isolées de 100 échantillons de viande de volaille fraîche commercialisés dans des boucheries localisées dans région Jijel (Algérie De l'est). Les résultats obtenus montrent que les groupes phylogénétiques A et B1 sont prédominants avec des taux respectifs de 67.5% et 16.9% suivis par B2 4.7% et D 11.76%. Les résultats des test de sensibilité aux antibiotiques révèlent trois grands groupes d'antibiotiques et plus de 13 antibiotypes, le premier rassemble les souches qui présentent 50% à 70% de résistances pour l'Ampicilline, l'Amoxicilline, la Triméthoprim, la Sulphonamide, la Tétracycline, le second rassemble les souches qui présentent 20% à 50% de résistances à l'Amoxicilline + acide Clavulanique, la Kanamycine, la Streptomycine, la Ciprofloxacine, la Flumequine et la Neomycine) et le troisième rassemble les souches qui présentent moins que 20% résistances pour la Cephalothin, et la Colistin. Les résultats du criblage des gènes de virulence par PCR montrent la prédominance des souches porteuses des gènes qui codent pour les facteurs de virulence affectés aux Extraintestinal pathogenic d'*Escherichia coli* (EPEC) avec un taux de 2,4% et l'existence des souches porteuses de gènes virulence caractéristiques des entéroagréatives *Escherichia coli* (EAEC) et les entéroinvasives *Escherichia coli* (EIEC). Nous avons aussi noté que les souches appartenant aux groupes phylogénétiques A et B1 présentent moins de facteurs de virulence et un taux de résistance aux antibiotiques alors que les souches appartenant aux groupes phylogénétiques B et D présentent un potentiel en facteurs de virulence élevé et des taux de résistances aux antibiotiques relativement bas.

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the prevalence, phylogeny, virulence markers and antibiorésistance of commensal *Escherichia coli*. In order to get this objective Eighty-five (85) *Escherichia coli* isolates were obtained from 100 chicken meat samples commercialised in butcheries localised in Jijel area (East Algeria). The results of this study showed that strains belonged to phylogenetic groups A and B1 which were the most common with respectively 67.5% and 16.9% followed by B2 4.7% and D 11.76% groups. AntibioGramme results revealed three great antibiotic resistant strains groups and more than one hundred antibiotype. The first strain group includes resistant strains to Ampicillin, Amoxicillin, Trimethoprim, Sulphonamid Tetracycline with the rates between 50% and 70% of all resistant strains. The second one has 20% to 50% of resistant strains to Amoxicillin plus Clavulanic acid, Kanamycin, Streptomycin, Ciprofloxacin, Flumequin, Neomycin. And the third group includes less than 20% of resistant strains to Cephalothin, Gentamicin and Colistin Furthermore, antibiorésistance to Flumequin, Trimethoprim, Sulfamethoxazole-Trimethoprim, and Tetracycline are more frequent in analysed chicken meat samples. PCR investigation showed the predominance of strains with Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) virulence factors related genes (2,4 %) and the presence of strains with EAEC and EIEC genes. We noted thus that strains carrying more than two virulence factors are belonged to B2 or D phylogenetic groups and present less resistance to antibiotics whereas strains belonged to group A or B1 present less virulence factors and high rate of antibiorésistance.

INTRODUCTION

La sécurité et l'innocuité des produits alimentaires restent des préoccupations primordiales aussi bien pour le consommateur que pour le producteur. En effet, plusieurs travaux montrent l'implication des produits alimentaires et particulièrement d'origine animale comme la viande bovine ou la viande de volaille dans les toxoinfections alimentaires. L'une des bactéries les plus incriminée est *Escherichia coli* et qui est normalement une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux (Holko et al., 2006). Durant les vingt dernières années plusieurs travaux ont montré la capacité impressionnante de cette espèce à incorporer dans son génome différents gènes se trouvant à sa portée en lui conférant ainsi des aptitudes de virulence et des résistances aux antimicrobiens très variables. Actuellement les souches issues de l'évolution génomique de cette bactérie sont classées en groupe phylogénique (A, B1, B2 et D) et en groupe de pathovars comme par exemple les enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) et les Extraintestinal pathogenic *E. coli* ExPEC.

Dans le but d'estimer le risque sanitaire de la large consommation de ses produits alimentaires nous nous sommes proposés (i) de constituer une collection de souches isolées à partir de la viande de poulet de chair commercialisée dans les boucheries traditionnelles de la région de Jijel (Est Algérie) puis (ii) de faire un criblage des gènes de virulences et enfin (iii) de faire une estimation de la sensibilité des souches isolées aux molécules d'antibiotique utilisées en médecine humaine et animale en Algérie.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Echantillonnage

100 échantillons de viande de poulet de chair ont été prélevés dans 10 boucheries implantées dans les différentes régions de la wilaya de Jijel (Est Algérie) puis acheminés dans des conditions adéquates d'asepsie et de température au laboratoire du département de microbiologie de l'université Mohamed Sedik BEN YAHIA, Jijel, Algérie. L'isolement et les identifications des souches de *E.coli* ont été effectués selon la méthode décrite par Carbonnelle et al 1987.

1.2. Recherches des groupes phylogéniques des souches isolées

Nous avons fait la recherche des groupes phylogéniques de l'ensemble des souches isolées par la méthode décrite par Clermont et al., 2000. Les ADN des souches de références adéquates ont été utilisés.

1.3. Criblage des gènes de virulence par PCR pour souches isolées de *E. coli*

Pour l'ensemble des souches nous avons procédé à la recherche de 10 gènes de virulences caractéristiques des ExPEC (*sfa/focDE*, *kpsMT* K1, *hlyA*, *papEF*, *afa/draBC*, *fyua*, *clbN*, *hlyF*, *f17A*, *cnf*), 3 gènes de virulence caractéristiques des EAEC (*AProbe*, *aap*, *et agg*), et 1 gène de virulence caractéristique de EIEC (*ipah*). L'extraction de l'ADN génomique et le criblage de l'ensemble gènes de virulence ont été effectués selon la méthode décrite par Alpha et al.(2013). Les ADN des souches de références adéquates et recommandées ont été utilisés.

1.4. Détermination de la résistance phénotypique des souches isolées

Enfin, nous avons procédé à la recherche de la résistance phénotypique des souches isolées par la technique des antibiogrammes. Les antibiogrammes ont été effectués selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2006). Nous avons en effet utilisé un milieu gélosé non sélectif de Mueller-Hinton. Afin de cibler les principales familles d'antibiotiques, 16 disques d'antibiotiques de chez Biorad ont été utilisés: Tétracycline (Tet) 75 µg, Ampicilline (Amp) 10 µg, (Amoxicilline + Clavulanic acid) (Amx+AC) (20+10 µg), Amoxicilline (Amx) 25 µg, Colistine (CT) 50µg, Cephalotine (CF) 30 µg, Chloramphenicol (C) µg, Gentamicine (Gn) 10 µg, Kanamycine (K) 30 µg, Streptomycine (S) 10 µg, Neomycine (N) 30 µg, Ciprofloxacine (Cip) 5 µg, Trimethoprim (TMP) 5 µg, Flumequin (UB30) 30 µg, Sulfamethoxazole-Trimethoprim (Sxt) (23.75 µg + 1.25 µg), L'interprétation des résultats a été réalisée selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2010) et la souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme contrôle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Collection des souches *E.coli*

Les analyses microbiologiques des échantillons de la viande de poulet de chair nous a permis d'isoler et d'identifier 85 souches de *E.coli*, ce qui implique que 85% des échantillons testés étaient souillés par des coliformes.

2.2. Criblage des groupes phylogéniques par PCR conventionnelle

Les résultats du criblage des groupes phylogéniques par PCR conventionnelle montre la prédominance des souches du groupe phylogénique A avec un taux de (62.35%), suivi par le groupe B1 avec un taux 18 (21.17%), D 10(11.76) et B2 avec un taux de 4 (4.7%).

Des résultats comparables ont été retrouvés par Unno et al., 2009, mais les résultats de Soufi et al. (2009) ont montré un nombre supérieur de souches du

groupe phylogénique D que celui que nous avons retrouvé. Figure(1)

2.3. Criblage des gènes de virulence

La prévalence des gènes de virulence caractéristique des souches appartenant au groupe des ExPEC étaient les plus élevés avec (24/85) soit 28,23% pour *hlyf*, *afa* (3.52%) (3/85), *fyuA* 11.76% (10/85) *clbN* 2.35% (2/85), suivi par le groupes des EIEC avec une souche porteuse de (*ipah*) soit (1.17%) et en fin une souche du groupe des EAEC porteuse du gène *aap* soit (1.17%) (1/85). Nous notons aussi l'absence des gènes de virulence *aggr*, *cnf*, *sfa/focDE*, *kpsMT* (K1), *and afa/draBC* pour l'ensemble des souches testées. Nos résultats sont en accord avec les travaux Johnson et al. (2005) et qui a montré que 46% des échantillons de poulet de chair de 10 supermarchés dans la région de Minneapolis–St.Paul (USA) durant 2001–2003 étaient contaminés par des souches ayant au moins un gène de virulence caractéristiques des ExPEC. Il est important de signaler que les souches appartenant aux groupe des ExPEC sont généralement responsables des maladies du tractus urogénital et de différentes maladies septicémiques chez l'homme et l'animal (Manges, A., and Johnson, J.R., 2012) Figure (2).

2.4. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques de l'ensemble des souches a révélé une prévalence de résistance élevée aux tétracyclines avec 96.41% (82/85) de souches résistantes, suivi par l'Amoxicilline et la Sulphonamide avec 51.76% (44/85), l'Ampicilline 50.58% (43/85), la Sulfamethoxazole-triméthoprim 48.23% (41/85), la Triméthoprim 44.70% (38/85), la Stréptomycine 34.11% (29/85), la Kanamycine et la Fluméquine 25.88% (22/85), la Ciprofloxacine 18.82% (16/85), l'Amoxicilline+ acid Calvulanique, la Néomycine 15.29% (13/85), la Colistine 11.76% (10/85), le Chloramphénicol 10.58% (9/85) et la Céphalotine 3.52% (3/85) Figure (3). En revanche,

l'ensemble des souches testées ont montré une sensibilité à la gentamycine. L'analyse des résultats du test de sensibilité aux antibiotiques nous a aussi permis de distinguer 13 groupes d'antibiogrammes majeurs, avec un groupe qui présente une résistance phénotypique à 13 molécules d'antibiotiques (Tableau 1). Ces résultats sont très alarmants et nous incite à appeler les autorités compétentes à prendre au sérieux l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et potentiellement pathogènes et toxigènes. Des résultats similaires ont été rapportés par Hammoudi et Aggad, (2008) et Aggad et al., (2010), ces derniers ont souligné l'apparition des souches multirésistantes dans les élevages avicoles de l'Ouest Algérien. D'autres auteurs ont montré que la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques par les souches multirésistantes (Gyles, 2008).

CONCLUSION

Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les groupes phylogéniques A et B1 sont dominants par rapport aux groupes B2 et D. Les gènes de virulence caractéristiques des ExPEC sont beaucoup plus élevés que ceux des EIEC et ceux des EAEC. Le test phénotypique de sensibilité aux antibiotiques révèle l'existence de souches multirésistantes aux molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et en médecine vétérinaire. À la lumière de ces résultats nous pouvons conclure aussi que les produits alimentaires d'origine animale et particulièrement la viande de poulet de chair en Algérie peuvent véhiculer et disséminer les pathovores de l'espèce *E.coli* dangereux pour le consommateur et multirésistants aux antibiotiques. Ces observations nous amènent à inciter les éleveurs, les commerçants et les autorités compétentes à respecter les règles d'hygiène et sanitaires dans la filière avicole en Algérie et cela dans le but de limiter l'émergence de nouvelles souches plus pathogènes et multirésistantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Anon, G., Vargues, R. 1987. Bactériologie médicale techniques usuelles. Ed., SIMEP, Paris, 329-330.
- CLSI, 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S20., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.19087, USA.
- Clermont O., S. Bonacorsi and E. Bingen, 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiology, 66 : 4555-4558.
- Aggad H., A. Y. Ahmed, A., Hammoudi and M. Kihal, 2010. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis. Global Veterinaria, 4, (3), 303-306,

Diallo, A. A., Brugère, H., Kerourédan M., Dupouy V., Toutain P.L., Bousquet-Mélou A., Oswald E., Bibbal D. 2013. Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. *Water Res.*, Vol. 47, (13), 4719–4729

Gyles C.L., 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews/Conference of Research Workers in Animal Dis.*, 9 : 149-158

Hammoudi A. and H. Aggad (2008). Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 32,(2), 123-126.

Holko I., T. Bisova, Z. Holkova and V. Kmet, 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheese made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*, 17 : 393–396.

Johnson J.R., S. Jelacic, L.M. Schoening, et al., 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and Immunity*;73: 965-971.

Manges A. R., P. M. Sherry, B. J. Lau, C. J. Nuval, J. N. S. Eisenberg, P. S. and Dietrich, L. W. Riley, 2007. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. *Foodborne Pathogen Dis.*,(4), 419-431.

Soufi L, M. S. Abbassi, Y. Saenz, L. Vinuae, S. Somalo, M. Zarazaga, A. Abbas, R. Dbaya, L. Khanfir, A. Ben Hassen, S. Hammami and C. Torres, 2009. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathogen Dis.*, (6), 1067–1073.

Unno T., D. Han, J.Jang, S.N. Lee, G. Ko, Y.C. Ha, H.K Joon, M.J Sadowsky and H.G. Hur 2009. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. *Applied and environmental Microbiology*, (75), 5659–5666.

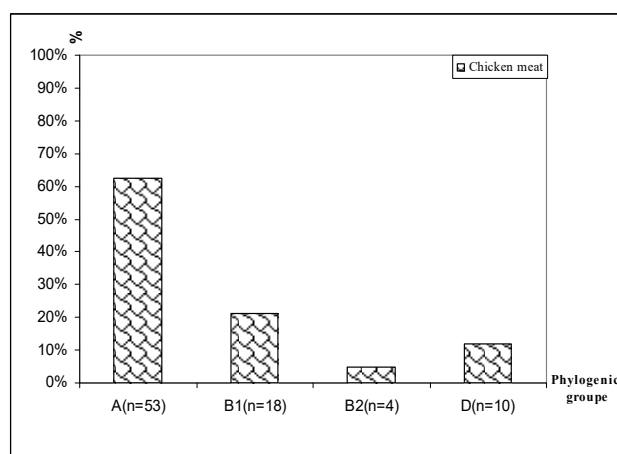


Figure 1: Répartition des groupes phylogéniques des souches de *E.coli* isolées des échantillons de viandes de poulet de chair.

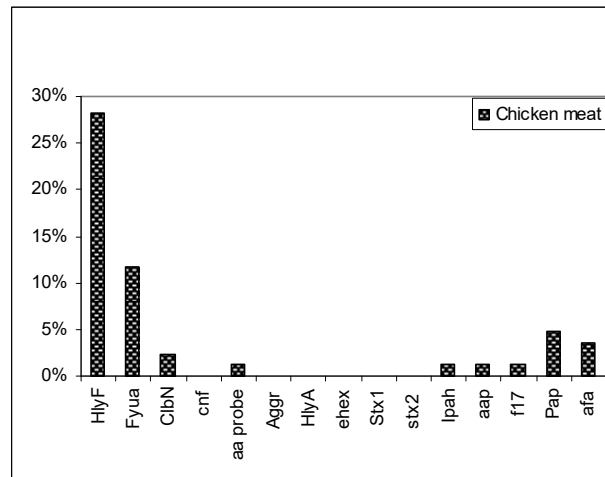


Figure 2: Distribution des genes de virulence détectés dans le génomes des *E.coli* isolées des échantillons de viande de poulet.

Table 2: Les antibiotypes phénotypiques majeurs de l'ensemble des souches analysées (n=85)

Antibiotypes	Nombre des isolats	Pourcentage des isolats %
Tet	7	8.23
Amp-Amx+AC	1	1.17
Tet-Tmp-STX.	4	4.70
Tet-Tmp-SXT-SSS	2	2.35
Amp-Amx-Tmp-Sxt-SSS	3	3.52
Am-Amx+A-SSS-Tm-Sxt-Tet	2	2.35
Amp-Amx-Tet-S-SSS-Tmp-Sxt.	1	1.17
Amp-Amx-Cip-UB30-SSS-Sxt-K-Tet	1	1.17
Amp-Tmp-Sxt-Tet-SSS-Amx-UB30-Cip-C	1	0.43
Amp-Amx-K-C-Sxt-Tmp-Cip-UB30-SSS-Tet	1	1.17
Amp-Amx-Amx+AC-Cip-Tmp-Sxt-SSS-K-S-T-C	2	2.35
Amp-Amx-K-N-S-Cip-UB30-Tmp-Sxt-SSS-Tet-C.	1	1.17
Amp-Amx-Amx+AC-K-N-Cip-UB30-SSS-Tmp-Sxt-Tet-C	1	1.17

(Tet : Tetracycline); (Amp: Ampicilline); (Sxt : Sulfamethoxazole-Trimethoprine); (SSS : Sulphonamide); (Amx : Amoxicilline); (TMP : Trimethoprine); (S : Streptomycine); (UB30 : Flumequine); (K : Kanamycine); (Cip : Ciprofloxacine); (Amx+AC : Amoxicilline plus acide Clavulanique); (CT : Colistine); (N : Neomycine); (C : Chloramphenicol); (CF : Cephalothine); (Gn: Gentamicine).