

7
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 23.72

جامعة محمد الصديق بن يحيى-جيجل-

Université Mohammed Seddik Ben Yahia-Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département: Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم : الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

رقم الملف :
تاريخ : 13/5/2015
ملاحظات :
ملاحظات :
ملاحظات :
ملاحظات :

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**
Option : Microorganismes et Pathogénicité

Thème

**Exploitation des travaux de recherche sur la virulence et
l'antibiorésistance des souches d'*Escherichia coli* isolées chez
une population humaine plus de 50 ans d'âge.**

Membres de Jury :

Présidente : Dr.Laggoune S.

Examinatrice: Dr.Akroum S.

Encadreur : Dr. Boudjerda Dj.

Présenté par :

- Bouchenak Meriama
- Chouat Razika

Année Universitaire 2015-2016

REMERCIEMENTS

*Nous tenons à remercier Allah, le tout puissant, de nous guidé
Sur le droit chemin, et de nous avoir donné la volonté et le courage
pour élaborer ce travail.*

*Au terme de ce travail, nos exprimer toute mes remerciements et mes profonde
gratitude à notre encadreur Mr Boudjedra. D pour ses précieux conseils et ses
efforts, son aide, sa gentillesse, ainsi que ses suggestions sur la rédaction de ce
mémoire tout au long de cette travail.*

*Notre grand remerciement à Dr. Laggounne. S pour son acceptation de présider le
jury de ce mémoire.*

*Notre remerciement les plus sincères sont adressés à Dr. Akroum. S pour avoir
accepté d'examiner ce travail.*

*Nos plus vifs remerciements a tous l'équipe de laboratoire central de l'hôpital
Taher.*

*Nous remercions également tous ceux qui ont contribués de prêt ou de loi à
élaborer notre mémoire .*

DÉDICACE

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie
mon travail à mes chers, respectueux et magnifique parents qui m'ont
soutenus tout au long de ma vie*

À mes sœurs et mes frères

À toute ma famille Et spécialement à mon petit oiseau

« Zizou »

À toi ma binôme Razika

*Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé et nous a aidé au long de mes
études*

À toi..... Mohammed

MERJAMA



DÉDICACE

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie,

que je dédie mon travail

A mes chers parents ma mère et mon père

Pour leur patience, leur amour, leurs soutiens et leurs encouragements

A mes frères et toute ma famille chacun son nom

A mes amies et mes camarades

Et en particulier à mon binôme Meriama

Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé et nous a aidé au

long de mes études

Razika



Sommaire

Page de titre	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1

I. Synthèse bibliographique

Chapitre I.1. Généralités sur les entérobactéries

I.1.1. Définition des <i>entérobactéries</i>	2
I.1.2. Classification des <i>entérobactéries</i>	2
I.1.3. Caractères cultureux des <i>entérobactéries</i>	2
I.1.4. Caractères antigéniques des <i>entérobactéries</i>	3
I.1.5. Habitat des <i>Entérobactéries</i>	3

Chapitre I.2. *Escherichia coli*

I.2.1. Généralité	4
I.2.2. Historique	4
I.2.3. Taxonomie et définition d' <i>Escherichia coli</i>	4
I.2.4. Habitat	4
I.2.5. Les souches variants d' <i>Escherichia coli</i>	5
I.2.5.1. Les <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	5
I.2.5.2. Les <i>Escherichia coli</i> entéroinvasives (EIEC)	5
I.2.5.3. Les <i>Escherichia coli</i> enterohémorragiques (EHEC)	6
I.2.5.4. Les <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (DAEC)	6
I.2.5.5. Les <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatives (EaggEC ou EAEC)	7
I.2.5.6. Les <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (EPEC)	7
I.2.6. Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes extraintestinaux (ExPEC)	7
I.2.7. Les Facteurs de virulences d' <i>Escherichia coli</i>	8
I.2.7.1. Facteurs facilitant la colonisation et l'invasion des surfaces cutané-muqueuses	8
a. Adhésines	8
b. Les systèmes de captation du fer	9
I.2.7.2. Facteurs d'échappement aux défenses de l'hôte	9
a. Capsule k1	9
b. Antigène O	10

I.2.7.3. Facteurs endommageant les cellules des tissus de l'hôte	10
a. Toxines.....	10
A. L'alpha-hémolysine.....	10
B. Les toxines de type Sat et Vat	10
I.2.8. Les ilots de pathogénicité	11

Chapitre I.3. Les cyclomodulines

I.3.1. Les Cyclomodulines, des toxines bactériennes qui altèrent le cycle cellulaire de l'hôte	11
I.3.1.1. CNF (Cytotoxic Necrotizing Factor)	12
I.3.1.2. CDT (Cytolethal Distending Toxin).....	12
I.3.1.3. La Colibactine.....	12
a. Machinerie PKS et synthèse de la Colibactine.....	12

Chapitre I.4. La résistance bactérienne et la sensibilité aux antibiotiques

I.4.1 Définition des antibiotiques.....	13
I.4.1.1. Classification	13
I.4.1.2. Mode d'Action des antibiotiques.....	14
I.4.2. La résistance bactérienne	14
I.4.2.1. Définition.....	14
I.4.2.2. Les types de la résistance bactérienne	15
a. La résistance naturelle ou intrinsèque	15
b. La résistance acquise.....	15
I.4.2.3. Mécanismes de la résistance.....	15

II. Matériel et méthode

II.1. Matériels.....	17
II.1.1. Milieux de culture	17
II.1.1.1. Milieux solides	17
II.1.1.2. Milieux liquides.....	18
II.2. Produits chimiques et réactifs.....	18
II.3. Disques d'antibiotiques	18
II.4. Autres matériels.....	18
II.4.1. Appareillages.....	18
II.4.2. Verrerie et autres	19
II.5. Méthodes	19
II.5.1. L'origine des souches bactériennes	19
II.6. Analyses microbiologiques	21
II.6.1. La revivification des souches d' <i>Escherichia coli</i>	21

II.6.2. La vérification de la pureté des souches.....	21
II.6.2.1. L'isolement par épuisement.....	21
II.6.2.2. Coloration de <i>Gram</i>	22
II.7. Profile de l'identification d' <i>Escherihcia coli</i>	23
II.7.1. La galerie biochimique classique.....	23
II.7.2. La galerie API20E.....	28
II.8. Test d'hémolyse.....	29
II.9. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	30

III. Résultats et discussion

III.1. Les résultats de screening de gènes de virulence.....	32
III.2. Résultats de la détermination des différents patterns de gènes de virulence.....	32
III.3. Résultat des tests de la sensibilité aux antibiotiques.....	35
III.3.1. Résultats de la revivification des souches d' <i>Escherichia coli</i> :.....	35
III.3.2. Résultats des analyses microbiologiques.....	35
III.3.2.1. L'isolement par épuisement.....	35
III.3.2.2. Coloration de <i>Gram</i>	35
III.3. Résultats de la vérification de la pureté des souches d' <i>Escherichia coli</i>	35
III.3.1. L'isolement par épuisement.....	35
III.3.2. Coloration de <i>Gram</i>	35
III.3.2.3. Profile de l'identification biochimique d' <i>E.coli</i>	36
III.4. Résultats de test d'hémolyse.....	36
III.5. Résultat des tests de la sensibilité aux antibiotiques.....	37
Discussion général.....	39
Conclusion	41
Références bibliographiques	42
Annexes	



Liste des abréviations :

ADH	Arginine Dihydrolase
A/E	Attachement/effacement
AA	« <i>aggregative adherence</i> »
AAF	« <i>aggregative adherence fimbriae</i> »
ADN	« Acide désoxyribonucléique »
AEEC	« <i>Attaching/effacing Escherichia coli</i> »
Afa	« <i>Afimbrial adhesin</i> »
Akt	« protéine kinase B »
<i>cdt</i>	« <i>cytholethal distensing toxin</i> »
CNF	« <i>cytotoxic necrotizing factor</i> »
CMI	« concentration minimale inhibitrice »
DAEC	« <i>Escherichia coli</i> d'adhésion diffuse »
EAF	« <i>EPEC</i> <i>adhesion factor</i> »
EaggEC ou EAEC	« <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatives »
EAST-1	« Enteroaggregative heat-stable toxin-1 »
EHEC	« <i>Escherichia coli</i> enterohémorragiques »
EPEC	« <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes »
ETEC	« <i>Escherichia coli</i> entérotoxinogènes »
ExPEC	« Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes extraintestinaux »
HeLa	« Cellules tumorales du col utérin d'Henrietta Lacks »
H ₂ H ₂	Eau oxygénée
HEp-2	« <i>human epithelioma pharynx n°2</i> »
Hly	« Hémolysine »
HPI	« High pathogenicity island »
LDC	Lysine Décarboxylase
LEE	« <i>locus of enterocyte effacement</i> »
LPP	Laboratoire de Phytopharmacologie et Phytochimie

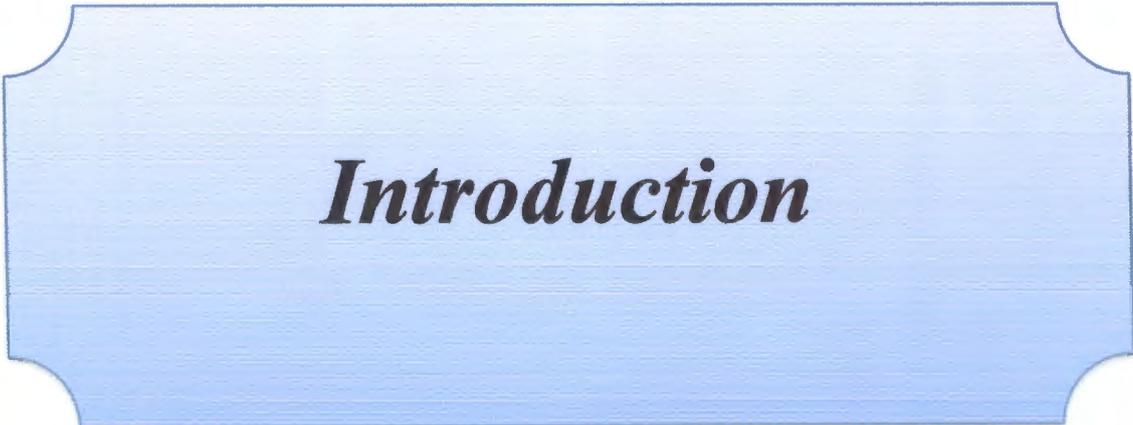
LT	« heat labile enterotoxin »
MH	« Mueller-Hinton »
PAI-1	« ilot de pathogénicité »
PLP	«protéines liant les pénicillines »
MNEC	«Meningitis associated <i>Escherichia coli</i> »
Nacl	Chlorure de sodium
ODC	Ornithine Décarboxylase
Sat	« <i>secreted autotransporter toxin</i> »
ShET1	« <i>Shigella</i> enterotoxin 1 »
SHU	« Syndrome hémolytique et urémique »
ST	« heat stable enterotoxin »
STEC	« Shiga-like toxin producing <i>Escherichia coli</i> »
TDA	Réactif perchlorure de sodium
TSI	Triple Sugar Iron
UIT	« Infection du Tractus Urinaire »
UPEC	« Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> »
Vat	« <i>vacuolating autotransporter toxin</i> »
VF _s	« les facteurs de virulences »
VG	Violet de Gentiane
VP	Voges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableau 01: Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique.....	13
Tableau 02: Mécanismes de la résistance bactérienne	16
Tableau 03: Différentes souches d' <i>Escherichia coli</i>	20
Tableau 04 : Prévalence (%) des gènes de virulence.....	32
Tableau 05 : Les différents patterns obtenus par la <i>PCR</i>	33
Tableau 06 : Profil d'identification d' <i>Escherichia coli</i> par la galerie API20E	36
Tableau 07 : Prévalence (%) d'hémolyse d' <i>Escherichia coli</i>	36
Tableau 08 : Relation entre patterns et test hémolyse.....	37

Liste des figures

Figure 1 : Les éléments génétiques mobiles	11
Figure 2 : Résumé des différents modes d'action d'antibiotique	14
Figure 3 : Principaux mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques	16
Figure 4 : Observation microscopique coloration de Gram d' <i>Escherichia coli</i>	35
Figure 5 : Prévalence(%) de la résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques testés.....	38



Introduction

Escherichia coli est un hôte normale de l'intestin de l'homme et des animaux. De nos jours elle est associée à de nombreuses pathologies intestinales et extra-intestinales, tant chez l'homme que chez les animaux domestiques (Robesto, 1988). Actuellement, les souches impliquées dans des infections intestinales chez l'homme sont classées en six pathotypes : les EPEC (« Enteropathogenic *E. coli* »), les EHEC (« Enterohaemorrhagic *E. coli* »), les ETEC (« Enterotoxigenic *E. coli* »), les EIEC (« Enteroinvasive *E. coli* »), les EAEC (« Enteroadgregative *E. coli* ») et les DAEC (« Diffusely adherent *E. coli* ») (Russo et Johnson., 2000). Outre ces pathovars responsables d'infections intestinales, d'autres pathovars sont à l'origine des infections extra-intestinales, comme les UPEC (pour « Uropathogenic *E. coli* »), responsables des infections du tractus urinaires, les *E. coli* associés à des méningites (MNEC) pour « Meningitis-associated *E. coli* ») ou à des septicémies.

Ces souches ont récemment été regroupées sous le terme de ExPEC (pour « Extra-intestinal pathogenic *E. coli* ») (Stenutz *et al.*, 2006). L'ensemble des souches d'*E. coli* pathogènes sont des souches qui ont développées différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés chez leur hôte. Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*E. coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont les suivants: colonisation des muqueuses, éventuellement invasion des cellules, multiplication, évasion des défenses de l'hôte, dommages à l'hôte.

La résistance des souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques est un problème mondial. Pour être efficace, la surveillance est nécessaire à trois niveaux : local, national et international. Au niveau local, l'information disponible sur la résistance doit être utilisée dans les hôpitaux pour mettre à jour les traitements et pour guider le contrôle de la résistance (Kang *et al.*, 2005 ; Belmonte et Jacoby., 2009).

Dans le but de contribuer à la connaissance du pouvoir pathogène des souches isolées à partir de l'intestin de patients hospitalisés, nous sommes proposés de faire le présent travail et qui se divise en deux parties : une partie bibliographique et une étude expérimentale et qui a pour objectifs (i) la discussion des résultats du screening des gènes de virulence d'une collection de souches fournies par le Laboratoire de phyto-pharmacologie et phytochimie. (ii) l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques. (iii) faire une comparaison sur le comportement des souches fournies par le laboratoire central de l'hôpital de Taher et les souches fournies par le Laboratoire de phyto-pharmacologie et phytochimie vis -à -vis des molécules d'antibiotiques testées.

Partie I

Synthèse bibliographique

I.1.1. Définition des *Entérobactéries*

Le nom *entérobactéries* a été d'abord proposé par *Rahn* en 1937 (**Baylis et al., 2011**). Les membres de cette famille souvent appelés entérobactéries ou bactéries entériques (du grec *enterikos*, appartenant à l'intestin) (**Prescott et al., 2000**).

Cette famille se définit par les caractères bactériologiques suivants:

- ❖ Bacilles à Gram négatif ;
- ❖ Mobiles avec ciliature péritriche ou immobiles;
- ❖ Poussant sur milieux de culture ordinaires;
- ❖ Aéro-anaérobies facultatifs;
- ❖ Fermentant le glucose avec ou sans production de gaz;
- ❖ Réduisant les nitrates en nitrites;
- ❖ Oxydase négatif (**Avril et al., 1992**).

I.1.2. Classification des *Entérobactéries*

Domaine : *Eubacteria*.

Phylum : *Proteobacteria*.

Classe : *Gammaproteobacteria*.

Ordre : *Enterobacteriales*.

Famille : *Enterobacteriaceae* (**Boone et Garrity., 2001**).

Cette famille bactérienne compte actuellement 53 genres (plus de 170 espèces).

I.1.3. Caractères cultureux des *Entérobactéries*

Les *Enterobacteriaceae* se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubés 18 heures à 37°C.

Les formes *S* (smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme. Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre. Le bouillon est trouble de façon homogène (**Avril et al., 1992**).

Les formes R (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate. En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux (Avril *et al.*, 1992).

Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm, elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, notamment *Salmonella paratyphi B* (Pilet *et al.*, 1979).

Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires (Avril *et al.*, 1992).

I.1.4. Caractères antigéniques des *Entérobactéries*

Les antigènes les plus importants de la famille *des Enterobacteriaceae* sont:

- ❖ les antigènes O : chaînes de polysaccharides spécifiques du complexe lipopolysaccharide de la membrane externe.
- ❖ les antigènes H : les antigènes flagellaires constitués de protéines.
- ❖ les antigènes K : les polymères linéaires des membranes externes constituées d'une répétition série d'unités d'hydrate de carbone (parfois aussi des protéines). Ils peuvent couvrir le cellulaire dense et les rendre O inagglutinables
- ❖ les antigènes F : Antigènes d'attachement de la protéine des fimbriaes (Fritz *et al.*, 2005 ; Kassama et Hamadi, 2013).

I.1.5. Habitat des *Entérobactéries*

Les entérobactéries sont ubiquistes mais généralement leur habitat naturel est le tractus intestinal des humains et des animaux. Certaines espèces causent des maladies caractéristiques. Tandis que d'autres sont facultatifs pathogènes, ils sont encore parmi les bactéries les plus souvent isolées sous forme d'agents pathogènes (par exemple *E. coli*) (Fritz *et al.*, 2005).

I.2.1. Généralité d'*Escherichia coli*

I.2.2. Historique

Escherichia coli est l'espèce de la famille des entérobactéries, elle a été identifiée pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle par le médecin Allemand *Théodor Escherich*. Lors de ses travaux, il réussit à isoler 19 souches bactériennes, des bacilles et des coques, à partir du colon du nouveau-né (Stanford et kalman., 2008), elle est universellement rencontrée dans le tube digestif, qu'il appela *Bacterium coli commune*, et que nous appelons aujourd'hui en son honneur *Escherichia coli* (Avril et al.,1992).

I.2.3. Taxonomie et définition d'*Escherichia coli*

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* (Torres, 2010) de la section Gracilicutes (Minaev , 2002), *Escherichia coli* est le bacille du côlon en français qui est une bactérie prédominante dans le tractus gastro-intestinale de l'homme (Kaper et al., 2004).

Probablement, *Escherichia coli* est l'espèce la plus connus et isolée dans les spécimens cliniques, *Gram* négative, bâtonnets droites, mobile avec une ciliature péritriche anaérobie facultatif, il se développe vite dans les milieux liquides à la température 37°C et à PH 7,2-7,4 (Frithz et al., 2015).

I.2.4. Habitat d'*Escherichia coli*

Comme l'ensemble des espèces des entérobactéries, *Escherichia coli ubiquiste*, mais elle est isolées généralement de l'intestins de l'homme et des animaux à sang chaud (Greatorer et Thorre., 1994).

En microbiologie alimentaire, elle est classiquement utilisée comme indicateur de la contamination fécale de l'eau potable, l'eau de baignade et des produits alimentaires.

Dans les laboratoires d'analyses médicales cette espèce reste la plus isolée appartir des matériaux pathologiques (Frithz et al., 2015).

1.2.5. Les souches variants d'*Escherichia coli*

Il existe plusieurs souches d'*Escherichia coli* que l'on retrouve en pathologie humaine. Ces derniers ont la capacité de provoquer des infections intestinales ou extra-intestinales (**Cohen et al., 2006**).

Actuellement, les souches impliquées dans des infections intestinales sont classées en six souches : les EPECs pour « Enteropathogenic *E. coli* », les EHECs « Enterohaemorrhagic *E. coli* », les ETEC « Enterotoxigenic *E. coli* », les EIECs « Enteroinvasive *E. coli* », les EAECs « Enteroaggregative *E. coli* » et les DAECs « Diffusely adherent *E. coli* » (**Elliott et al., 2011**).

1.2.5.1. Les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC sont à l'origine d'épisodes de diarrhée aqueuse, modérée à sévère, peu fébriles, associés à des nausées et à des crampes abdominales (**Kaper et al., 2004**).

Les souches *Escherichia coli* entérotoxigènes ont le pouvoir d'exprimer un ou plusieurs entérotoxines (**Baylis et al., 2011**) responsable des diarrhées et différentes par leur stabilité à la chaleur: l'entérotoxine stable (ST) et l'entérotoxine labile à la chaleur (LT).

Les gènes codant pour ST, LT et les facteurs de colonisation sont portés par les plasmides. *Escherichia coli* entérotoxigènes se trouve en grande partie dans les pays en cours de développement (**Prescott et al., 2000**).

1.2.5.2. Les *Escherichia coli* entéroinvasives (EIEC)

Les *Escherichia coli* entéroinvasives sont semblables au *Shigella* biochimiquement, génétiquement et pathologiquement. Habituellement véhiculé par la nourriture. EIEC adhère aux cellules épithéliales de l'iléon ou du colon, qu'il envahit et détruit (**Paul et al., 2004**).

Les *Escherichia coli* entéroinvasives peuvent causer la dysenterie (**Roland et al., 2006**). La présence de leucocytes dans les selles est le témoignage du processus invasif (**Avril et al., 1992**). Cette propriété invasive est associée à la présence d'un grand plasmide. Les EIEC produisent aussi une cytotoxine et une entérotoxines (**Prescott et al., 2000**).

I.2.5.3. Les *Escherichia coli* enterohémorragiques (EHEC)

Les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques, encore appelés *E. coli* producteurs de Shiga-toxines ou *E. coli* producteurs de vérotoxines, La plupart des souches EHECs provoquent des lésions dites « d'attachement et d'effacement » (A/E) des cellules de la muqueuse de l'iléon distal et du côlon, par l'intermédiaire d'une protéine de membrane, l'intimine (Mariani-kurkdjian *et al.*, 2014). Les lésions donnent des colites hémorragiques avec des crampes et de fortes douleurs abdominales suivies de diarrhées sanguinolentes (Prescott *et al.*, 2000).

Au sein du locus chromosomique « LEE » (*locus of enterocyte effacement*). Ces souches sont appelées EHEC « typiques ». Des souches LEE négatives ont également été associées à le syndrome hémolytique urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) chez l'homme SHU. Ces souches sont qualifiées de souches «EHEC atypiques» (Mariani-kurkdjian *et al.*, 2014).

Il a été démontré que les *Escherichia coli* enterohémorragiques sont responsables de diarrhées, de dysenteries et de pathologies extra-intestinales comme le syndrome hémolytique urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) chez l'homme .En 1982, Deux épidémies d'un syndrome diarrhéique sanglant et sévère étaient liées à la consommation des hamburgers dans l'Oregon et Michigan (Sperandio et Hovde., 2015).

I.2.5.4. Les *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les *Escherichia coli* à adhésion diffuse produisent une adhérence diffuse sur les cellules en culture Hela (Cellules tumorales du col utérin d'Henrietta Lacks) et Hep-2 (*human epithelioma pharynx n°2*) (Roland *et al.*, 2006).

Cette adhérence est favorisé par des protéines codées par une famille d'opérons, qui incluent à la fois les adhésines fimbriales et les adhésines afimbriales (appartenant à la famille Afa/Dr) (Alain *et al.*, 2004).

Les *Escherichia coli* à adhésion a diffuses sont considérées comme une cause de la diarrhée aiguë chez les enfants et persistantes en dans les pays développés et en voie de développement (Garcai *et al.*, 1996).

I.2.5.5. Les *Escherichia coli* entéro-agrégatives (EaggEC ou EAEC)

Les *Escherichia coli* entéro-agrégatives(EAEC) sont considérées comme un agent pathogène très important dans plusieurs scénarios clinique (Boisen *et al.*, 2008). Les souches EAECs sont de plus en plus souvent incriminées dans des cas de diarrhée persistante, chez l'enfant comme chez l'adulte, dans les pays dits en voie de développement mais aussi dans les pays industrialisés (McNamira *et al.*, 1995).

Les souches EAEC se caractérisent par un type d'adhésion agrégative en " briques empilées" dans la surface des cellules de l'hôte (Baylis *et al.*, 2011), les adhésines de la famille Dr et favorisent l'adhérence d'EAEC à la muqueuse intestinale trois variants d'AAFs (AAF/I, AAF/II, AAF/III) ont été identifiés, respectivement sont codés par les gènes de virulences: *aggA*, *aafA*, et *agg3A* (Boisen *et al.*, 2008).

I.2.5.6. Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)

Les EPECs agit après adhésion (sans invasion) aux microvillosités de l'intestin grêle (Prescott *et al.*, 2000) par l' intermédiaire d'un facteur d'adhésion(EAF) .Comme ,il injecte des

toxiques dans les entérocytes ,au moyen d' un système de sécrétion de type III (Frithz *et al.*, 2005). Les EPEC font parties du groupe des pathogènes entraînant des lésions de type attachement/effacement (A/E) des cellules de l'épithélium intestinale (Matthews *et al.*, 2010).

Ce phénotype caractéristique des EPEC est codé par des gènes regroupés sur un îlot de pathogénicité de 35 Kb, le LEE pour « locus of enterocyte effacement» (Mcdaniel *et al.*, 1994).

Les *Escherichia coli* entéropathogènes étaient responsables, dans Les années 1950, de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités (Avril *et al.*, 1992).

I.2.6.Les *Escherichia coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC)

Les souches d'*Escherichia coli* qui possèdent facultativement de la pathogénicité peuvent provoquer les eschérichioses parentérales, c'est-à-dire des lésions en dehors du système gastro-intestinale (Minaev *et al.*, 2002).

Ces souches ExPEC sont responsables d'infections du tractus urinaire (cystites et pyélonéphrites), de la cavité abdominale (péritonites), de méningite du nouveau né, de la pneumonie nosocomiale (Johnson *et al.*, 2003).

De plus, *Escherichia coli* a été impliqué dans les septicémies, récemment les rapports de la bactériémie sont augmentés (Baylis *et al.*, 2011).

Les UPEC sont les bactéries les plus impliquées dans les infections du tractus urinaire (ITU) (70% des cas). Les infections urinaires sont très fréquentes, environ 150 millions de cas par an dans le monde (Stamm *et al.*, 2001). A côté des UPEC, les NMEC sont la première cause de méningites (Ying *et al.*, 2004).

Les ExPEC sont distribués principalement dans le groupe phylogénétique B2, et dans une moindre mesure dans le groupe D (Petit *et al.*, 2013)

I.2.7. Les Facteurs de virulences d'*Escherichia coli*:

De nombreux facteurs interviennent dans le pouvoir pathogène des *Escherichia coli*, et la combinaison d'un ensemble de ces facteurs seraient selon leurs natures (Cohen et Karib., 2006).

L'expression de différents facteurs de virulences (VFs), il est compris les différentes : adhésines, les toxines, les sidérophores, les systèmes de sécrétions (Donnenberg, 2002), ou une protéine autotransporteur (sat), qui agit comme une toxine protéolytique, ils sont situés dans des îlots de pathogénicité (Bergh *et al.*, 2006) qui perturbe le fonctionnement de l'intestin (la diarrhée) et provoque la déshydratation.

Certaines souches ont le facteur d'invasion qui favorise la pénétration des bactéries à l'intérieur des cellules intestinales (Minaev *et al.*, 2002).

I.2.7.1. Facteurs facilitant la colonisation et l'invasion des surfaces cutané-muqueuses

a. Adhésines

Les adhésines sont des fimbriaes et sont codées par des plasmides. Les fimbriaes sont des polypeptides spécifiques des récepteurs saccharidiques, généralement des glycolipides, présents à la surface des cellules eucaryotes. Ils sont composés des sous-unités protéiques répétées organiques en structures hélicoïdales formant des appendices à la surface bactérienne on compte plus de dix types

différentes d'adhésines sur le fimbriaes mais, il existe plusieurs types d'adhésines localisés ailleurs. (Paul *et al.*, 2004 ; Bing, 1998).

Les P *fimbriae* sont morphologiquement très proches des *fimbriae* de type 1 (Hull *et al.*, 1981). Elles sont codées par l'opéron *pap* et ce sont des hétéropolymères composés notamment d'une sous unité principale *papA* (codée par *papA*) dont il existe de nombreux variants (Fredric *et al.*, 1987). Elles assurent la fixation de la bactérie aux cellules uroépithéliales par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (Bing, 1998).

F17 est codé par FY² ou Att25 (Michèle Mouricout *et al.*, 1995). La colonisation par les facteurs d'adhésines fimbriaes type 1 et type 2 de la famille F17 a été identifiée chez *Escherichia coli* nécrotoxogènes, cette famille inclue quatre variantes antigéniques des sous-unités de la protéine majeur de la fimbriaes, ces variantes sont codées par l'opéron F17, et qui est composée de F17a, F17b, F17c, and F17d (Mainil *et al.*, 2000).

b. Les systèmes de captation du fer

Notamment, le sidérophore, codé par l'îlot de pathogénicité HPI (High pathogenicity island) retrouvés chez les *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (Mariani-Kurkdjia *et Bingen.*, 2012). Les sidérophores permettent de capter le fer libre en fournissant aux bactéries le fer indispensable à leur multiplication, au détriment de la transferrine. Les récepteurs cellulaires des sidérophores chargés sont les protéines de la membrane externe, qui sont aussi des récepteurs de phages (Cohen *et Karib.*, 2006).

I.2.7.2. Facteurs d'échappement aux défenses de l'hôte

a. Capsule k1

Généralement, les souches ExPEC qui causent la méningite néonatale sont associées à l'antigène K1. L'expression de l'antigène K1 par les NMEC pour améliorer la survie des bactéries dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (Jann *et Jann.*, 1992).

Certaines bactéries afin d'échapper à la réponse immunitaire sont capables de synthétiser les polysaccharides capsulaires K1, 2 et 3 (codées respectivement par *kpsMTI* ou *neuC*, II et III) (Allen *et al.*, 1987).

b. Antigène O

L'antigène O est un polysaccharide qui est constitué de 10-25 sous unités répétitives de sucres ancrées dans le noyau externe de la composante de lipopolysaccharides de la membrane bactérienne (Travis *et al.*, 2008).

I.2.7.3. Facteurs endommageant les cellules des tissus de l'hôte

a. Toxines

A.L'alpha-hémolysine

L'alpha-hémolysine, d'origine chromosomique et fréquente pour des souches uropathogènes ou autres infections extra-intestinales humaines. On trouve l'hémolysine alpha, codées par le cluster *hly*. Elle fait partie de la famille des toxines forment des pores au niveau de la membrane cellulaire. La toxine *hlyA* est sécrétée par un système de sécrétion de type I.

α -Hémolysine (*hlyA*) est une toxine protéique (107 kDa) sécrétée par des souches pathogènes d'*Escherichia coli*, elle est codée par α -hémolysine (*hlyA*) est caractérisé par la protéine RTX, qui est sécrétée par un système de sécrétion type I (Herlax *et al.*, 2005 ; Ivaylo *et al.*, 2002). *hlyA* peut aussi inhiber l'activation d'Akt (protéine kinase B) et provoquer des oscillations de la concentration de calcium intracellulaire, ce qui module la survie de la cellule hôte, la réponse inflammatoire, la prolifération et le métabolisme (Wiles *et al.*, 2008)

hlyF est codé par l'hémolysine F, il joue un rôle dans la virulence chez *Escherichia coli* extra-intestinales (Tchioffo *et al.*, 2016), *hlyF* est épidémiologique associé avec la méningite néonatale de l'homme (Murase *et al.*, 2015).

B.Les toxines de type Sat et Vat

Sat (*secreted autotransporter toxin*) et Vat (*vacuolating autotransporter toxin*) sont des toxines la famille des auto-transporteurs (Charbonneau, 2012). Elles vont produire une vacuolisation et un engorgement cellulaire. Le rôle de Vat dans la pathogénèse d'une infection extra-intestinale n'a pas encore été bien identifié. Par contre, la toxine Sat provoque une vacuolisation cellulaire avec de effets cytopathiques mais sans avoir un rôle déterminé dans la colonisation de la bactérie (Guyer *et al.*, 2002 ; Maroncle *et al.*, 2006).

1.2.8. Les îlots de pathogénicité

Un îlot de pathogénicité est un groupe ou cassette de gènes qui codent pour un ensemble de caractères de virulence. L'îlot de pathogénicité de 35kb appelé locus d'effacement des entérocytes (LEE) est présent dans toutes les souches d'EPEC (Paul *et al.*, 2004). Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE, codant un système de sécrétion particulier, le système de type III, et trois classes de protéines sécrétées (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2012).

Les souches d'UPEC (*E. coli* uropathogène) contiennent un îlot de pathogénicité de 70Kb (l'îlot PAI-1) qui code pour une hémolysine (Stamm *et al.*, 2001).

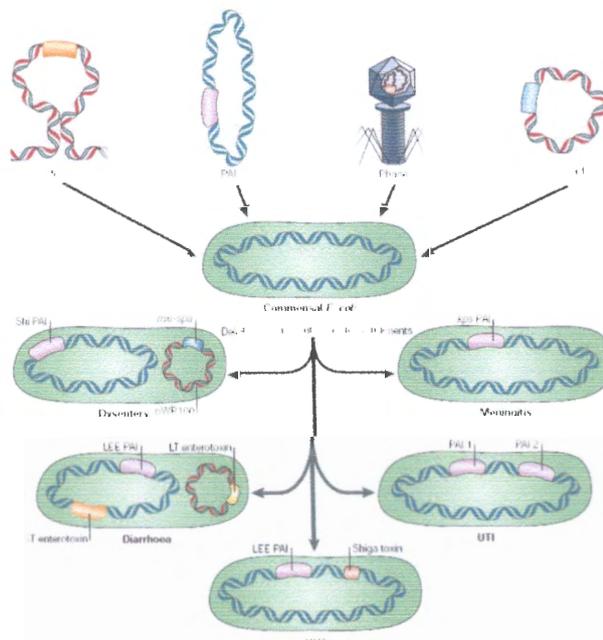


Figure 1 : Les éléments génétiques mobiles.

I.3.1. Les Cyclomodulines, des toxines bactériennes qui altèrent le cycle cellulaire de l'hôte

Les cyclomodulines sont une famille de toxines et effecteurs bactériennes qui perturbent le déroulement normal du cycle cellulaire des cellules hôtes (Oswald *et al.*, 2005), soit en l'arrêtant (cyclomodulines inhibitrices) soit en le stimulant (cyclomodulines stimulatrices), ils ont été identifiés chez les *E. coli* et en particulier chez les EPEC et les EHEC (Nougayrède *et al.*, 2005).

I.3.1.1. CNF (Cytotoxic Necrotizing Factor)

CNF1 (Cytotoxic Necrotizing Factor) a été découverte par Caprioli En 1983. Cette équipe a observé qu'un facteur produit par des *E. coli* isolées d'entérites (Garcai *et al.*, 1996).

Les toxines CNF (*Cell Necrotising Factor* ou *facteur nécrosant des cellules*) (Passoret, 2012) sont de grosses protéines de 110 kDa qui sont codées par un gène présent dans des îlots de pathogénicité ou sur un plasmide de virulence (Wiles, 2008). Les souches d'*Escherichia coli* sont produites deux facteurs de CNF : CNF1 et CNF2 (Blanco *et al.*, 1992).

I.3.1.2. CDT (Cytotoxic Distending Toxin)

CDT (Cytotoxic distending toxin) est la première toxine bactérienne décrite comme un provoquant de l'arrêt du cycle cellulaire eucaryote. Elle est composée de trois sous-unités : CdtA, CdtB and CdtC (Nougayrède *et al.*, 2005 ; Ellen Sayuri *et al.*, 2014).

les toxines CDTs sont trouvées chez de nombreuses espèces bactériennes comme : *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* et *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus ducreyi*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Bouzari *et al.*, 2004 ; Alby *et al.*, 2001).

I.3.1.3. La Colibactine

L'îlot génomique de la Colibactine a été découvert dans *Escherichia coli*, la Colibactine produit des cassures double brin d'ADN des cellules de leur hôte. Les souches des *Escherichia coli* productrices de colibactine appartiennent au groupe phylogénétique B2 (Homburg *et al.*, 2007 ; Putze *et al.*, 2009).

a. Machinerie PKS et synthèse de la Colibactine

L'ilôt *pks* possède 23 gènes (*clbC*, *clbG*, *clbI*, *clbN*, *clbO*, *clbP*, *clbR* et *clbA*), à l'exception du gène *ClbM*, toutes les protéines codées par le cluster *pks* sont nécessaires pour que la machinerie puisse produire un métabolite final actif putatif, la «Colibactine».

Plusieurs souches d'*Escherichia coli* commensales et extraintestinales de groupe phylogénétique B2 codent pour des *NRPS* et des *PKS*. Ce sont des enzymes multifonctionnelles, qui sont trouvées dans des bactéries et des champignons (Homburg *et al.*, 2007 ; Nougayrède *et al.*, 2006).

I.4.1. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des médicaments capables de tuer les micro-organismes sensibles (effet bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique).

Découverte en 1928 par le biologiste et pharmacologue écossais Sir Alexander Fleming. L'utilisation des antibiotiques en tant que médicaments chez l'Homme et l'animal est considérée comme un des progrès majeurs de la médecine (Doublet, 2012).

I.4.1.1. Classification

Il existe différentes classifications des antibiotiques. Une des principales classifications est la classification chimique, elle basée sur la structure du produit (voir le **Tableau 01**) (Minaev, 2002).

Tableau 01 : Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique

Classe	Représentants
B-lactames	Pénicilline, céphalosporine
Macrolydes	Erythromycine, oléandomycine, asythromycine
Aminoglycosides	streptomycine, amikacine, getamycine, néomycine
Tétracyclines	Tétracycline, doxycycline, métacycline, oxytétracycline
Amphénicols	Chloramphénicol (lévomycéthine) Synthomycine
Ansamycines	Rifamycine rifampicine
Polypeptides	Polymyxine Bacitracine
Polyènes	Nystatine, Amphotéricine B

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs (**Franck, 2007**).

1.4.2.2. Les types de la résistance bactérienne

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance naturelle et la résistance acquise.

a. La résistance naturelle ou intrinsèque

Est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques (**Courvalin, 2007**)

b. La résistance acquise

Résistance qui apparaît chez des bactéries jusqu'alors sensibles aux antibiotiques, consécutives à des modifications de l'équipement génétique chromosomique ou elles ne concernent que quelques souches d'une même espèce mais peuvent s'étendre. Ces changements (**Lavigne, 2007**).

Ces bactéries peut devenir résistant par :

- ❖ mutation chromosomique
- ❖ l'acquisition d'un nouveau matériel génétique qui code les protéines responsables du phénotype de résistance (**Fred, 2009**).

1.4.2.3. Mécanismes de la résistance

Ils peuvent être regroupés en quatre grands types de mécanisme (**Tableau 02**)

Tableau 02 : Mécanismes de la résistance bactérienne (Lozniewski, 2010).

Mécanismes de la résistance	Conséquence
Inactivation enzymatique	production d'enzymes inactivant les antibiotiques
Modification de la cible des antibiotiques	modification des PLP (protéines liant les pénicillines) sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane
Diminution de la perméabilité	mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie
Efflux actif	capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce un canal, cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

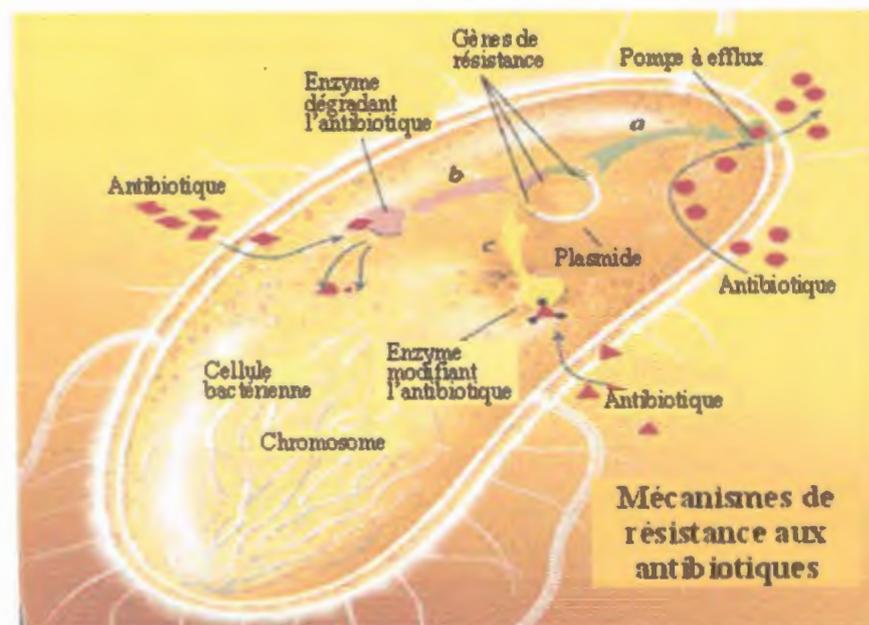


Figure 3 : Principaux mécanismes bactériennes de résistance aux antibiotiques (Doublet, 2012).

Partie II

Matériels et Méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau du Laboratoire de la Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel et le laboratoire centrale de l'hôpital de Taher durant la période du 4 Avril jusqu'au 30 Mai 2016.

❖ **But de notre travail**

Escherichia coli est une bactérie commensale du tube digestive de l'homme et des animaux. Cette bactérie est connue par les chercheurs pour son pouvoir d'adaptation aux différents écosystèmes et son pouvoir d'incorporer dans son génome des gènes qui peuvent se trouver dans son milieu ambiant.

Ces aptitudes ont permis à cette bactérie d'acquérir des pouvoirs enzymatiques de plus en plus performants et des facteurs de virulences de plus en plus dangereux. De nos jours on assiste à l'apparition de souches qui sont pathogènes et difficilement contrôlables. Tel et le cas pour les souches ExPEC porteuses de gènes qui codent pour la toxine colibactine. Dans le but de contribuer à la connaissance des caractéristiques de ces souches notre travail a pour but de déterminer les patterns de gènes d'une collection de 60 souches (**Tableau 3**) et leur sensibilité à certaines molécules d'antibiotiques.

II.1. Matériels

II.1.1. Milieux de culture

II.1.1.1. Milieux solides

- ✓ Milieu «**Mueller-Hinton**» : pour réaliser l'antibiogramme.
- ✓ Milieu «**Héktoén**» : pour la purification d'*Escherichia coli*.
- ✓ Milieu «**Gélose nutritive inclinée**» : pour conserver et contrôler la pureté des souches d'*Escherichia coli*.
- ✓ Milieu «**Gélose au sang**» : pour réaliser le test d'hémolyse.
- ✓ Milieu «**Gélose nutritif**» : pour préparer la gélose nutritive inclinée.
- ✓ Milieu «**TSI**» : pour rechercher la fermentation du glucose, lactose, saccharose et la production de gaz et H₂S.
- ✓ Milieu «**Mannitol-mobilité**» : permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité de la souche.

II.1.1.2. Milieux liquides

- ✓ Milieu «**Bouillon nutritif**» : pour la purification d'*Escherichia coli*.
- ✓ Milieu «**Moeller**» additionné d'arginine, d'ornithine, de lysine : pour la recherche de ADH, ODC et LDC.
- ✓ Milieu «**Urée-indole**» : pour la recherche d'uréase et la production d'indole.
- ✓ Eau distillée : pour la préparation de l'eau physiologique.
- ✓ Eau physiologie : pour la préparation des suspensions bactériennes d'*Escherichia coli*.

II.2. Produits chimiques et réactifs

- ✓ Chlorure de sodium (NaCl) : pour préparer l'eau physiologique.
- ✓ Violet de gentiane.
- ✓ Fuschine.
- ✓ Lugol.
- ✓ Alcool.
- ✓ Huile à émulsion.
- ✓ Eau oxygénée (H₂O₂) : pour rechercher l'enzyme Catalase.
- ✓ Réactif «**KOVACS**» : pour mettre en évidence la production d'indole.
- ✓ Réactifs KOH (VP1) et d'alpha-naphtol (VP2) : pour mettre en évidence la production d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne).

II.3. Disques d'antibiotiques

- ✓ Amoxicilline (25 µg).
- ✓ Streptomycine (500 µg).
- ✓ Pénicilline (10 µg).
- ✓ Colistine sulfate (50 µg).

II.4. Autres matériels

II.4.1. Appareillages

- ✓ Etuve à 175°C (Memmert).
- ✓ Etuve à 37°C (Memmert, INB500).
- ✓ Réfrigérateur (EniEM).
- ✓ Autoclave (Pbibrand).

- ✓ Bain marie (Gerhardt).
- ✓ Microscope optique (Olympus).

II.4.2. Verrerie et autres

- ✓ Lames.
- ✓ Cristallisateur contenant un désinfectant.
- ✓ Flacons stériles.
- ✓ Tubes à essai stériles.
- ✓ Pipette graduée (10ml).
- ✓ Boîtes de Pétri stériles.
- ✓ Anse de platine stérile.
- ✓ Eppendorfs stériles.
- ✓ Coton tiges stériles.
- ✓ Cures dents stériles.
- ✓ Emportes pièces.
- ✓ Portoirs.
- ✓ Pince.
- ✓ Pipeteur.

II.5. Méthodes

II.5.1. L'origine des souches bactériennes

L'ensemble des souches d'*Escherichia coli* ont été fournies par:

- ✓ Le laboratoire de phytopharmacologie et phytochimie (LPP) de l'Université de Jijel (50 souches).
- ✓ Le laboratoire central de l'hôpital de Taher (10 souches).

Il faut noter que:

- ✓ 41 souches fournies par le laboratoire de phytopharmacologie et phytochimie (LPP) ont été soumises à un screening d'après la méthode décrite par (Vallance *et al.*, 2002)
- ✓ de gènes de virulence: *Clbn*, *hlyF*, *kpsMT(k1)*, *hlyA*, *sfa/fccDE*, *f17*, *cnf*, *papEF*, *afa/draBC*.
- ✓ Les souches fournies par le laboratoire central de l'hôpital de Taher n'ont pas été soumises à un screening de gènes de virulences.

0 : absence de gène de virulence.

II.6. Analyses microbiologiques

II.6.1. La revivification des souches d'*Escherichia coli*

- **Objectif**
 - ✓ Pour obtenir des cultures jeunes.
- **Technique**

Elle est effectuée selon la méthode décrite par (Boubetraet *al.*, 2006).

- ✓ Les souches récupérées au niveau de laboratoire phytopharmacologies et phytochimie (LPP) et le laboratoire central de l'hôpital de Taher ont été repiquées dans le bouillon nutritif.
- ✓ L'incubation est effectuée à 37 °C pendant 24h.
- **Lecture**

Après 24 h d'incubation.

- ✓ Les bouillons doivent montrer un trouble: *Escherichia coli* revivifiée.
- ✓ Les bouillons restant claires sont considérés négatifs (absence de pousse de la souche d'*Escherichia coli* testée).

II.6.2. La vérification de la pureté des souches

- **objectif**

la vérification de la pureté des souches est basée d'une part sur la réalisation de cultures sur le milieu Héктоén et d'autre par la réalisation des colorations de Gram pour l'ensemble des souches testées.

II.6.2.1. L'isolement par épuisement

- **Technique**

Elle est effectuée selon méthode décrite par (Lecoanet, 1992).

- ✓ Dans un flacon de la gélose «Héктоén» (gélose additionnée de l'additif de l'Héктоén) fondue et maintenue à 100°C, couler la gélose préparée dans les boîtes de Pétri et laisser prendre en masse au moment de l'utilisation.

- ✓ A l'aide d'une anse de platine stérile, faire un isolement par épuisement en surface à partir du bouillon nutritif.
- ✓ Incuber à 37° C pendant 24 heures.
 - **Lecture**

Après 24h d'incubation.

- ✓ Les cultures doivent montrer une uniformité de la forme des colonies. Pour les souches *Escherichia coli* forment des colonies jaunes saumon sur le milieu héctoén.

II.6.2.2. Coloration de Gram

- **Objectif**
 - ✓ Vérifier la pureté des souches d '*E. coli*.
- **Technique**

Elle est effectuée selon la méthode décrite par (Martin, 2003).

➤ **Préparation de frottis**

- ✓ Nettoyer une lame par l'alcool.
- ✓ Faire un frottis sur une lame de verre bien dégraissée, déposer à l'aide d'une anse de platine stérilisée conformément une goutte de l'eau physiologique, puis prélever une goutte de la suspension bactérienne d'*Escherichia coli*.
- ✓ Frotter la pointe dans la goutte d'eau physiologique par mouvement circulaire.
- ✓ Laisser sécher à l'air libre.
- ✓ Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

➤ **Coloration**

- ✓ Recouvrir le frottis avec une solution de Violet de gentiane (VG) : laisser en contact pendant une minute, puis laver à l'eau ordinaire.
- ✓ Recouvrir le frottis avec le Lugol (L) et laisser en contact pendant 1 minute, laver à l'eau ordinaire.
- ✓ Décolorer à l'alcool pendant 30 secondes, laver à l'eau ordinaire.
- ✓ Recouvrir la lame par la solution Fuchsine pendant 1 minute, laver à l'eau ordinaire.
- ✓ Sécher délicatement entre deux feuilles de papier absorbant.
- ✓ L'observation microscopique se fait à l'immersion.

➤ **Observation au microscope**

✓ Observer la préparation au microscope optique (objectif x 100 à immersion).

• **Lecture**

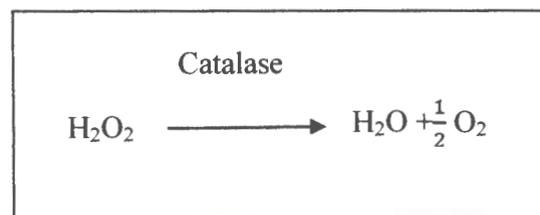
✓ *Escherichia coli* se forme de bacille à Gram (-).

II.7. Profile de l'identification d'*Escherichia coli*

II.7.1. La galerie biochimique classique

❖ **Recherche de la Catalase**

La catalase est une enzyme qui permet de dégrader l'eau oxygénée issue de la voie respiratoire oxydative directe en eau et en oxygène libre qui se dégage sous forme gazeuse.



• **Technique**

Elle est décrite par (Dart, 1996; Lansing *et al.*, 2003).

- ✓ Déposer sur une lame de verre 1 ou 2 gouttes d'eau oxygénée (H₂O₂).
- ✓ Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur.
- ✓ Dissocier la culture dans la goutte d'eau oxygénée (H₂O₂).

• **Lecture**

- ✓ La présence d'une catalase se traduit par la formation de bulles due à un dégagement gazeux immédiat.

❖ **Métabolisme glucidique**

▪ **Attaque du mannitol (milieu mannitol mobilité)**

• **Principe**

Le mannitol est un produit dérivé du D-Mannose sa dégradation comparable à celle du glucose et conduit à la formation d'acide à chaîne très courtes comme l'acide acétique.

Le milieu mannitol mobilité permet d'étudier, outre la dégradation du mannitol, la mobilité des germes bactériens.

- **Technique**

Elle est effectuée par méthode décrite par (Guiraud, 1980).

✓ Le milieu est ensemencé par piqûre centrale avec anse de platine puis incubé à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

✓ Fermentation du mannitol : virage du milieu au jaune.

✓ Dans le cas contraire le milieu garde sa couleur initiale.

✓ Mobilité : les germes mobiles diffusent à partir de la strie d'ensemencement en créant un trouble du milieu, les germes immobiles cultivent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

- **Utilité du milieu TSI (milieu complexes permettant l'étude simultanée de plusieurs sucres)**

- **Principe**

Le milieu TSI permet la recherche de cinq (05) caractères:

✓ Glucose (recherche au niveau du culot).

✓ Lactose (recherche au niveau de la pente).

✓ Saccharose (recherche au niveau de la pente).

✓ H₂S: noircissement du milieu.

✓ Gaz: de nombreux germes conduisent à l'attaque des glucides jusqu'au stade CO₂.

La présence du gaz se traduit soit par des bulles d'air, soit par décollement de la gélose.

- **Technique**

✓ Ensemencer le milieu TSI à l'aide d'une anse de platine stérile par piqûre centrale dans le culot et par des stries superficielles sur la pente.

✓ Après l'incubation à 37°C pendant 24h, on fait la lecture.

- **Lecture**

✓ Le glucose fermenté, le culot est jaune, s'il ne l'est pas le culot reste rouge.

✓ Le lactose fermenté, la pente verte au jaune, s'il ne l'est pas, la pente est rouge.

- ✓ Production du sulfite d'hydrogène (H₂S), le culot et la pente sont noires.
- ✓ S'il y a formation de bulle de gaz, le glucose est fermenté avec production du gaz.

❖ **Métabolisme protéique et des acides aminés**

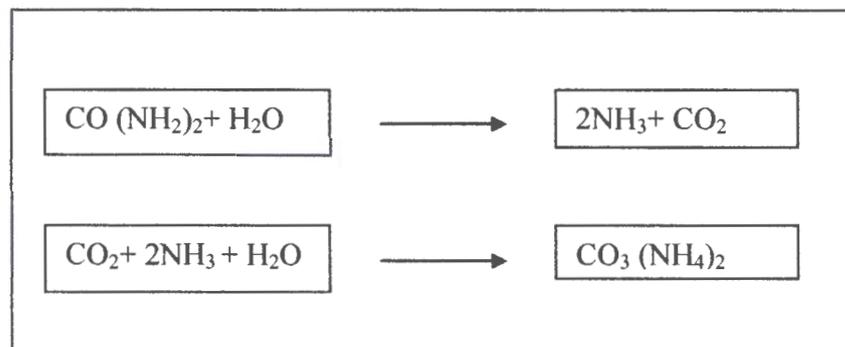
▪ **Recherche d'uréase et la production d'indole**

• **But**

Ce test permet de connaître si la bactérie possède l'uréase et capable de production d'indole.

• **Principe**

Les microorganismes possédant une uréase très active transforment l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium.



Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu, décelable par un indicateur coloré. La recherche de l'uréase peut s'effectuer par culture sur milieu liquide urée-indole.

Après culture, ce milieu prend une teinte rouge due à l'augmentation du pH, si l'urée est dégradée le milieu incubé sert ensuite à la caractérisation de l'indole par la réaction de KOVACS.

• **Technique**

Elle est effectuée par méthode décrite par (Guiraud *et al.*,1980).

- ✓ Ensemencer le milieu urée-indole à l'aide d'une anse de platine stérile, puis on l'incube pendant 24 heures à 37°C , par la suite, on ajoute 3 gouttes de réactifs d'Erlík- Kovacs le long des parois du tube, on homogénéise et on laisse reposer.

• **Lecture**

- ✓ Si le test pour l'uréase est positif : il y a virage de couleur au rouge violacé uréase (+).
- ✓ Si le test pour l'uréase est négatif : il n'y a aucun changement de couleur uréase (-).

- ✓ Après ajouter le réactif d'Erlick-kovacs: la formation d'un anneau rouge en surface indique la présence d'indole.

- **Recherche des décarboxylases**

- ✓ Lysine décarboxylase (LDC).
- ✓ Ornithine décarboxylase (ODC).
- ✓ Arginine dihydrolase(ADH).

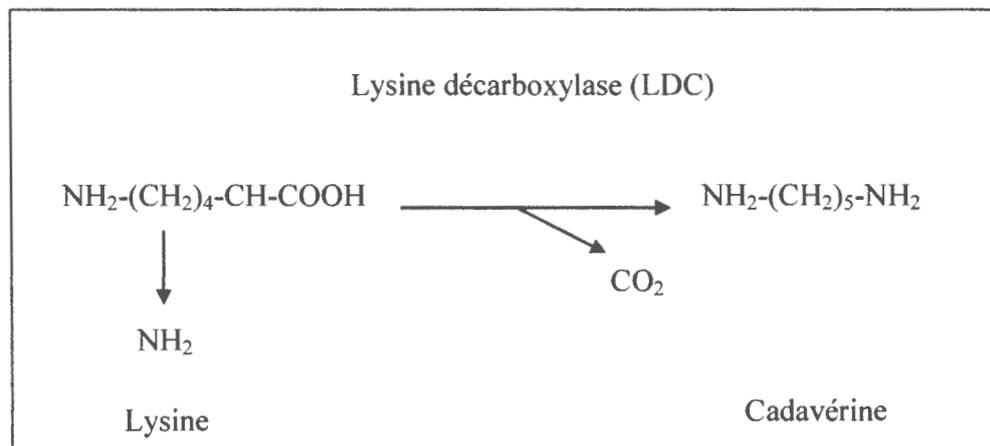
- **Objectif**

Recherche si la bactérie ayant des enzymes: LDC, ODC, ADH qui dégradent des acides aminés.

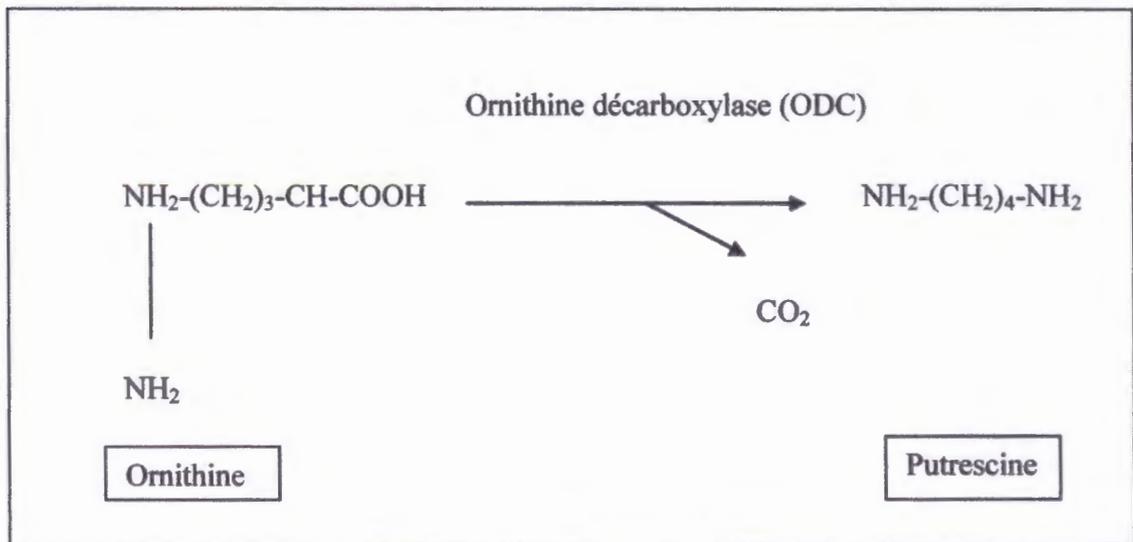
- **Principe**

Les enzymes (LDC, ODC, ADH) dont l'action est favorisée en milieu acide, forment à partir des acides aminés, des substances alcalines qui font virer un indicateur de pH.

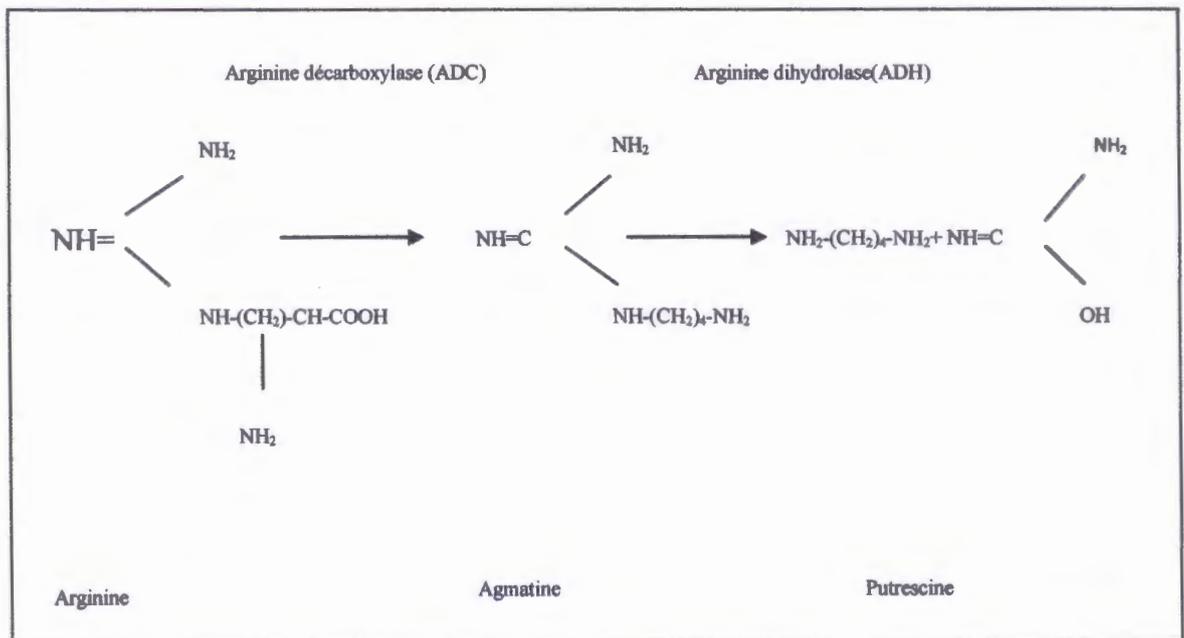
- La lysine est alors transformée en cadavérine.



- L'Ornithine est décarboxylée pour donner la Putrescine.



- L'Arginine est décarboxylée en Agmatine puis hydrolysée en Putrescine.



- **Technique**

Elle est effectuée selon la méthode décrite (Guiraud *et al.*, 1980).

- ✓ Verser les trois milieux (LDC, ODC, ADH) dans trois tubes différents, puis ensemencer chacun des trois tubes avec une culture bactérienne pure à l'aide d'une anse de platine.
- ✓ Porter les tubes à l'incubation pendant 24h à 37°C.
- **Lecture**
- ✓ Le virage au violet avec un trouble indique la présence de LDC, ODC et ADH.

II.7.2. La galerie API20E

La galerie API20E est une galerie dédiée à l'identification des entérobactéries, et est relativement simple à mettre en place, mais nécessitant travailler en condition stérile puisqu'une seule souche bactérienne est étudiée à la fois.

- **Principe**

La galerie API20E comporte 20 cupules contenant des substrats déshydratés. Les cupules sont inoculées avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- **Technique**

- ✓ A partir de gélose nutritive inclinée, prélever une colonie d'*Escherichia coli* avec une pipette Pasteur.
- ✓ Tremper la colonie prélevée dans 5ml d'eau distillée stérile pour obtenir une suspension bactérienne.
- ✓ Reprendre 5ml d'eau distillée sur les alvéoles du fond de la boîte d'inoculation, pour créer une atmosphère humide.
- ✓ Inoculation de suspension bactérienne de toutes les cupules de la galerie API20E à l'aide de la même pipette Pasteur.
- ✓ Pour les tests CIT remplir la cupule avec de l'huile de vaseline pour créer une anaérobiose.
- ✓ Refermer la boîte et incuber à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

- ✓ Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- ✓ Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
- ✓ Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- ✓ Test IND : ajouter 1 goutte de réactif KOVACS. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- ✓ Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ourouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- ✓ A partir de la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API20E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives.

II.8. Test d'hémolyse

- **Objectif**

Pour vérifier le pouvoir hémolytiques des souches bactériennes testées.
- **Préparation de milieu**
 - ✓ Dans un flacon de la gélose «**Mueller – Hinton** » fondue et maintenue à 45 C°, incorpore 10ml de sang humain de l'hôpital, homogénéiser puis couler la gélose préparée dans les boîtes de Pétri et laisser prendre en masse.
- **Technique**

Elle est effectuée selon la méthode décrite par (Timothy *et al.*, 2009)

 - ✓ Flamber l'anse de platine, laisser refroidir bien, puis racler au niveau de la gélose nutritive inclinée, ensemer et faire des stries parallèles de 1.5cm sur la gélose au sang humain, chaque strie représente une souche d'*Escherichia coli*.
 - ✓ Incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures.
- **Lecture**

Après 24h d'incubation.

 - ✓ Absence d'halo d'éclaircissement autour de la colonie : absence d'hémolyse.

II.9. Test de sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme consiste à évaluer l'antibiotique vis-à-vis des traitements possibles chez un patient, d'où son intérêt en milieu médical.

- **Principe**

Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien sont déposés à la surface d'un milieu adéquat préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester.

Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées et les zones d'inhibition entourant les disques sont mesurées et comparées aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

- **Technique**

La méthode utilisée est celle de la diffusion sur gélose décrite par (Carbonelle *et al.*, 1987), et selon les conditions du travail au laboratoire, elle est effectuée sur 60 souches d'*E. coli*.

- **Préparation de milieu gélosé**

- ✓ Faire fondre la gélose «**Mueller Hinton** » dans un bain marie à 100°C.
- ✓ Laisser refroidir, puis couler dans les boîtes de Pétri et laisser prendre en masse.

- **Préparation de l'inoculum**

- ✓ A partir d'une culture pure de la gélose nutritive inclinée toucher à l'aide de l'anse de platine stérile le sommet de 3 ou 4 colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- ✓ Décharger l'anse de platine dans 10 ml d'eau physiologique.
- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

- **Ensemencement**

- ✓ Ensemencer toute la surface par étalement à l'aide d'un coton-tige préalablement stérilisé.

- **Application des disques**

- ✓ Après séchage des boîtes, les disques choisis sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose.
- ✓ Une distance minimale de 1,5 cm doit séparer un disque périphérique au bord de la boîte.
- ✓ Incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

Après 24h d'incubation

- ✓ Une souche est dite sensible à un antibiotique si sa croissance peut être réduite par un traitement standard à base de cet antibiotique.

- ✓ Une souche est dite intermédiaire à un antibiotique si elle n'est pas atteinte par un traitement standard, mais si une augmentation de la dose d'antibiotique permet de détruire ce germe. Cette augmentation peut être celle de la dose administrée ou celle de la concentration tissulaire.
- ✓ Une souche est dite résistante à un antibiotique si elle ne peut être atteinte par un traitement, même en augmentant les doses d'antibiotiques.

Partie III

Résultats et discussions

Et on peut donner comme exemples, Les toxines décrites chez les *ExPEC*, on trouve alpha hémolysine est codée par le cluster *hlyA*, elle peut inhiber l'activation d'AKt (protéine kinase B) et provoquer des oscillations de la concentration de calcium cellulaire, ce qui module la survie de la cellule hôte, la réponse inflammatoire, la prolifération et le métabolisme (Wiles *et al.*, 2008 ; Hacker *et al.*, 2000 ; Hammon *et al.*, 2007). Elle peut provoquer une lyse cellulaire ou la libération du contenu cytosolique (Ramos, 2010). *hlyF* est porté par certains plasmides impliqués dans différentes maladies extra-intestinales.

Les toxines nécrotiques sont considérées comme des toxines protéolytiques (Bergh *et al.*, 2007). Les *cnf* facilitent la colonisation bactérienne par stabilisation des protéines GTPases de la famille Rho (Wiles, 2008).

La colibactine (*clbN*) qui fait partie des protéines sidérophores, mais cette toxine provoque des cassures double brin d'ADN des cellules de leur hôte, ce qui la qualifie d'être à l'origine de cancers et/ou de nécroses cellulaires. Les souches d'*Escherichia coli* productrices de la colibactine appartiennent généralement au groupe phylogénétique B2 (Homburg *et al.*, 2007).

Parmi les adhésines, des souches uropathogènes humaines se trouvent de l'adhésine G (Rhen *et al.*, 1986), et qui est un membre de la famille des fimbriaes *f17*, ces dernières ont comme récepteurs différentes parties de molécules contenant une entité " N-Acétyl-DGlucosamine " terminale dans leur portion saccharidique, sont en fait bien mieux connus chez les animaux, plus particulièrement chez les ruminants (Mainil, 2003).

Une autre adhésines, les S fimbriae sont codées par cluster de gènes *sfa*, elles sont utilisées par les souches UPEC et MNEC pour s'attacher aux récepteurs de l'acide sialique dans les cellules uroépithéliales et du cerveau (Blomfield, 2001). Généralement, les groupes de gènes *sfa/focDE* sont présentés en une seule copie sur le chromosome et ne paraissent pas liés à des gènes codant pour d'autres facteurs potentiels de virulence. Certaines souches, cependant, renferment plusieurs copies de ces gènes, dont certaines peuvent être liées à d'autres déterminants potentiels de virulence sur un îlot de pathogénicité.

Les P fimbriae sont morphologiquement très proches des fimbriaes de type 1. Elles sont codées par l'opéron *pap*. *papEF* confèrent aux bactéries la capacité de s'attacher aux cellules de l'hôte.

Les adhésines afimbriales *afa/draBC* sont régule la cascade du complément et protège les cellules eucaryotes contre une action mal dirigée de ce dernier (Mainil, 2003).

Les capsules *kpsMT(k1)* sont constituées de couches de polysaccharides assemblés à la surface de la bactérie. Elles interfèrent avec l'action du complément et des phagocytes (Bergh *et al.*, 2007).

III.3. Résultat du test de sensibilité aux antibiotiques

III.3.1. Résultats de la revivification des souches d'*Escherichia coli*

Les résultats de la revivification des souches d'*Escherichia coli* montrent un trouble dans l'ensemble des bouillons nutritifs ensemencés.

III.3.2. Résultats de la vérification de la pureté des souches d'*Escherichia coli*

III.3.2.1. L'isolement par épuisement

Les résultats de l'isolement par épuisement sur gélose Héктоén s'est traduit par l'apparition de colonie jaune orange lactose(+) et présentent une forme homogène régulière.

III.3.2.2. Coloration de Gram

Les résultats de la coloration de Gram montrent la présence des bacilles homogènes roses ne présentent pas de formes bactériennes étrangères (Figure 4).



Figure 4 : Observation microscopique de la coloration de Gram d'*Escherichia coli*.

III.3.2.3. Profil de l'identification biochimique d'*E.coli*

L'identification biochimique par la galerie API20E a confirmé leur identification comme *E. coli* (Tableau 06). L'identification est obtenue à partir du profil numérique correspondant à la souche de code: 5144572

Tableau 06 : Profil d'identification d'*Escherichia coli* par la galerie API20E.



ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

III.4. Résultats de test d'hémolyse

Les résultats positifs de test d'hémolyse se traduisent par la présence d'un Halo d'éclaircissement au tour de la culture bactérienne sur gélose au sang, nos résultats montrent la prédominance des souches d'*Escherichia coli* possédants un pouvoir hémolytique (83.33%), de plus les souches ayant les gènes *clbN*, *hlyF*, *HlyA*, *Cnf* sont toutes hémolytiques. En effet, ces souches produisent soit des hémolysines soit des facteurs de nécrose cellulaire. Nos travaux sont en accord avec ceux de et qui ont montrés l'effet cytonécrotiques de ces toxines sur des cellules vivantes en culture. Il faut noter aussi que les souches locales présentées un taux de pouvoir hémolytique beaucoup plus faible 10 (16.66) que les souches fournies par le laboratoire phytopharmacologie et phytochimie (Tableau 07 et Tableau 08) (Bergh *et al.*, 2007).

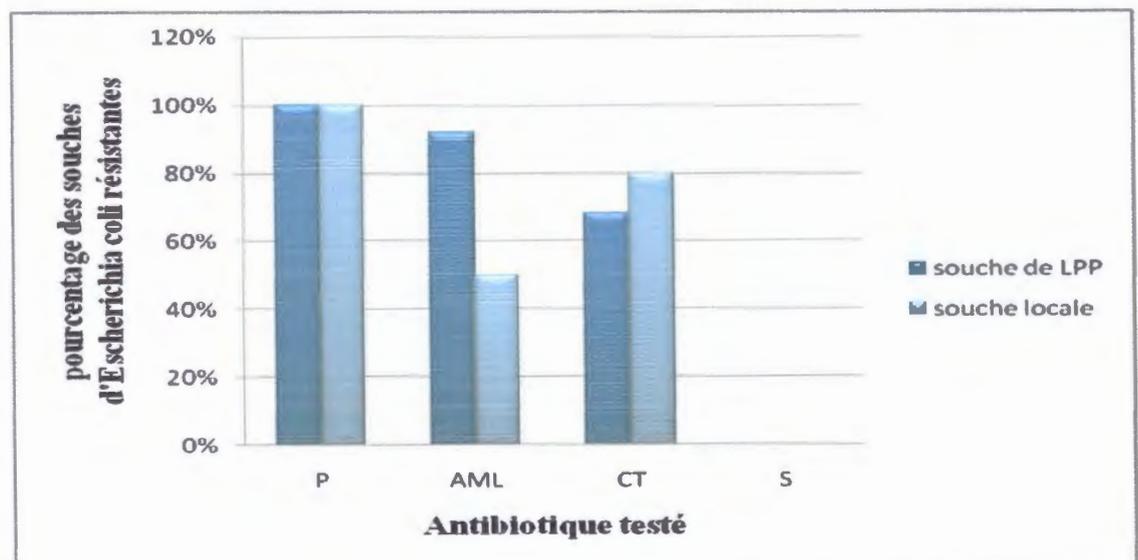
Tableau 07 : Prévalence (%) de l'hémolyse des souches d'*Escherichia coli*.

Hémolyse	Prévalence n(%) N=60
Souches hémolytiques	50(83,33)
Souches non hémolytiques	10(16.66)

Parmi les antibiotiques testés, la prévalence de la résistance à la Pénicilline est la plus élevée (100%), suivie par l'Amoxicilline (13,33%), de la Streptomycine(16,66%) et de la Colistine Sulfate (30%).

Le taux de la résistance aux antibiotiques testés au cours des deux groupes a montré qu'en général, les souches fournies par le laboratoire phytopharmacologie et phytochimie (LPP) présentent un taux de résistance plus élevés par rapport aux souches d'*Escherichia coli* fournies par le laboratoire central de l'hôpital de Taher (Figure 5).

L'émergence et la diffusion dans des populations humaines de bactéries pathogènes et résistantes est devenue un problème de santé d'ampleur mondiale. En effet, la résistance bactérienne aux antibiotiques pose des problèmes surtout au médecin clinicien comme le choix des molécules d'antibiotique actif sur la bactérie pathogène, éviter un échec thérapeutique et la sélection d'autres mutants résistants qui étaient jusqu'alors sensibles (Belmonte et al., 2009).



P:Pénicilline, AML: Amoxicilline, CT: Colistine sulfate, S:Streptomycine.

LPP : laboratoire phyto-pharmacologie et phytochimie.

Figure 5 : Prévalence(%) de la résistance des souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques testés.

Discussion générale

Notre travail est basé sur l'étude des gènes de virulence d'une collection des souches fournie par le laboratoire phyto-pharmacologie et phytochimie et d'autre collection fournies par le laboratoire centrale de l'hôpital de Taher.

Le screening des gènes de virulence a révélé la prédominance des souches porteuses de la colibactine et d'autre gènes de virulence tel que: *sfa:focDE*, *cnf*, *kpsMT(k1)*, *hlyA*, Les autres gènes montrent des prévalences relativement plus faibles comme pour *hlyF*, *afa/draBC*, et *F17*.

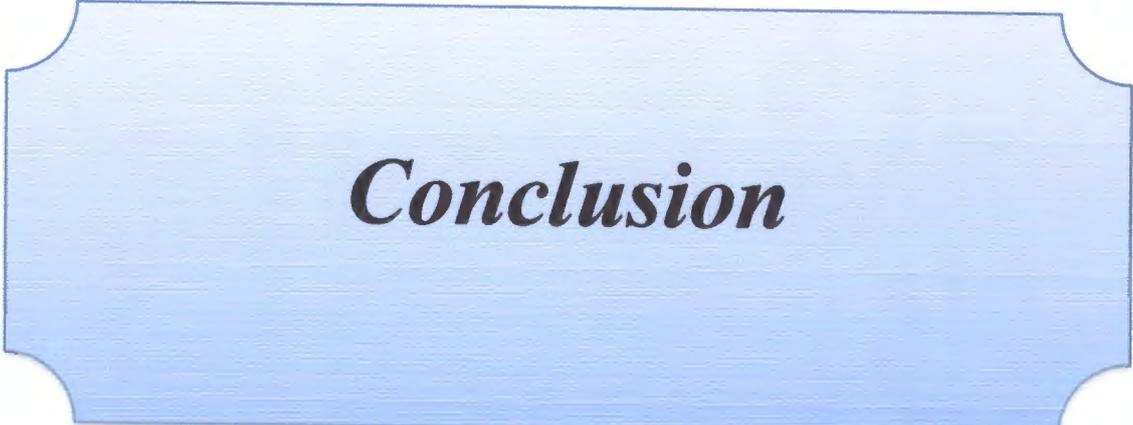
Les résultats de la détermination des patterns, permet d'identifier 19 patterns différents qui portent un nombre des gènes variés de 1 à 7 gènes de virulence. La majorité des souches possèdent un nombre élevé de gènes de virulence et peuvent donc être considérées potentiellement pathogènes pour l'homme. Certains de ces gènes sont présentés sur le chromosome au niveau d'îlots de pathogénicité ou sur des plasmides qui sont des éléments génétiques mobiles pouvant participer au transfert horizontal des gènes de virulence (Oelschlaeger, 2002) à d'autres bactéries. C'est le cas notamment pour le gène *papEF* (codant pour une fimbriae de type P), et les gènes *hlyA* et *cnf* (codant pour deux toxines) qui sont associés dans un îlot de pathogénicité chez certaines souches responsables d'épisodes d'ITU (Sabate, 2008). Il en est de même pour le gène *sfa/focDE* qui code pour un *fimbriae* impliqué dans des cas de méningites et pyélonéphrites (Mainil, 2003). Il existe des preuves de l'implication de *pap* dans le développement d'ITU. Une étude a mis en évidence que 80% des souches responsables de pyélonéphrites a exprimée *papG* qui partage la même famille avec *papEF* (Tiba, 2008). Le gène *clbN* dont la prévalence a été très élevée, c'est une génotoxine associée aux souches responsables de maladies extra-intestinales et est porté par l'îlot de pathogénicité *pks* (Nougayrede et al., 2006). Certains des gènes que nous avons trouvés sont codés par des plasmides susceptibles d'être transmis à d'autres souches (Mellata, 2009). C'est le cas de *hlyF* dont le rôle dans les infections extra-intestinales demeure inconnu. Ce gène est porté par certains plasmides impliqués dans différentes maladies extra-intestinales, or ces plasmides sont connus pour porter d'autres gènes de virulence mais aussi des gènes de résistance aux antibiotiques (Peigne, 2009). Les souches porteuses du gène *f17* ont été uniquement isolées dans les effluents d'origine humaine.

Les résultats de test de sensibilité aux antibiotiques montrent que La majorité des souches d'*Escherichia coli* étaient résistantes aux antibiotiques de la famille Béta-lactamines (pénicilline, amoxiciline). Ces résultats peuvent expliquer par l'utilisation élevée des antibiotiques dans le traitement des maladies.

Discussion générale

L'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques est la conséquence de la pression de sélection exercée sur la microbiote intestinal des hommes et des animaux sous antibiothérapie.

Enfin, notre étude souligne l'importance de la surveillance des flux des gènes de virulence des *E. coli* pathogènes et/ou résistants aux antibiotiques dans les populations bactériennes de l'environnement afin de prévenir les risques dangereux pour la santé publique.



Conclusion

Dans le cadre de la contribution à la connaissance des facteurs virulence pouvant être porter par le génome de l'espèce *Escherichia coli*, nous somme proposés à effectuer le screening des gènes de virulences (*clbN*, *sfa/focDE*, *cnf*, *kpsMT(k1)*, *papEF*, *hlyA*, *hlyF*, *afa/draBC*, *f17*) sur une collection de 41 souches d'*Escherichia coli*, les résultats révèlent que le gène *clbN* a une prévalence globale plus élevée par rapport aux autres gènes de virulence (*sfa/focDE*, *cnf*, *kpsMT(k1)*, *papEF*, *hlyA*, *hlyF*, *afa/draBC*, *f17*).

Ainsi, la détermination des différents patterns sur une collection de 41 souches d'*E. coli* nous a permis d'identifier 19 patterns différents et allant d'un seul gène à sept gènes de virulence.

Le test de sensibilité a été bien démontré que le taux de la résistance des souches de laboratoire phytopharmacologie et phytochimie aux antibiotiques testés est plus élevé que les souches d'origine locale. Cette résistance, se développe et diffuse à travers le monde bactérien grâce à des facteurs responsables (mutation génétique, acquisition des gènes de résistance ou par pression de sélection à l'hôpital et dans l'environnement extrahospitalier).

***Références
bibliographiques***

- Alain B., Archambaud M., Clave D. 2004.** Fiche technique : *Proteus mirabilis* BLSE. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique., **51**: 540-543.
- Alby E. M., Wieler L. H., Ewers C. 2009.** Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.*, **42**:18-22.
- Allen P. M., Roberts I., Boulnois G. J., Saunders J. R., Hart C. A. 1987.** Contribution of capsular polysaccharide and surface properties to virulence of *Escherichia coli* K1. *Infect. Immun.*, **55**:2658-2662.
- Allen E.M., Matthews B., Stratton H.M., Katouli M. 2012.** Pathogenic *Escherichia coli* found in sewage treatment plants and environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78** :5536-5541.
- Avril J.L., Henry D., François D., Henri M. 1992.** Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. p :150.
- Baylis C., Uyttendaele M., Joosten H., Andy D. 2011.** *Enterobacteriaceae* and their Significance to the Food Industry. ILSI Europe Emerging Microbiological Issues Task Force., p : 6.
- Belmonte K., and Jacoby G. A. 2009.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **54**:969-976.
- Bergh L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Gleier K. 2007.** Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.*, **42**:1099-1098.
- Bing, Y., Martin C., Oswald E., Girardeau J. P. 1998.** Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **34**:2921-2928.
- Bingen E., Bidois M., Clermon O. t, Bonacorsi, M. Terki S., Brahimi N., Loukil C., Barraud D. 2012.** Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.*, **70**:3216-3226.
- Blanco M., Blanco J. E., Alonso M. P., Blanco J. 1992.** Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *Eur. J. Epidemiol.*, **12**:191-198.
- Blomfield K. A., Beutin L., Gleier K., Pearce J. L., Luke R. K., Zimmermann S. 2003.** Serotypes of *Escherichia coli* isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne, Australia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **26**:55-63.
- Boisen N., Struve C., Scheutz F., Krogfelt K. A., Nataro J. P. 2008.** New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect. Immun.*, **76**:3281-3284.
- Boubetra M., Blanco J. E., Dahbi G., Alonso M. P., Mora A., Coira M. A., Madrid C., Juarez A., Bernardez M. I., Gonzalez E. A., Blanco J. 2006.** Identification of two new intimin types

in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Int.Microbiol.,9:103-110.

Bouzary M., Clermont O., Bonacorsi S., Terki M., Brahimi N., Loukil C., Barraud D., Bingen E. 2004. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichiacoli* bearing pathogenicity island-like domains. Infect. Immun.,70:3216-3226.

Boone D.R., Garrity G. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. 2nd Edition. p :721.

Carbannelle B., Denis F., Marmonier A. 1987. Bactériologie Médicale :Techniques usuelles. SIMEP SA. Paris., p :121-155.

Cohen L.C., Franzolin M.R., Trabulsi L. R. 2006. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. Mem.Inst. Oswaldo.Cruz.,99:545-552.

Courvalin K.G., Robbins D., Leong J. M. 2007. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. Dev.Cell., 7:217-228.

Dart M., Clement S., Desautels C., Oswald E., Fairbrother J. M. 1996. Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. Microbiol.Lett.,152:307-312.

Donnemberg G., Filioussis V., Economou I., Apostolou G., Zakkas A., Salamoura A., and Levidiotou S. 2002. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. Int. J. Food.Microbiol.,82:273-279.

Doublet B., Bousquet-Mélou A., Madec J.Y. 2012. Le concept « One Health » en antibiorésistance et les flux de gènes. Innovations Agronomiques 24(2012),p : 79-90.

Elliott C., Antao E. M., Diehl I., Philipp H. C., Wieler L. H. 2011. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. Appl. Environ.Microbiol.,75:184-92.

Frank, C., Werber D., Cramer J. P., Krause G. 2007. Epidemic profile of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. N. Engl. J. Med.,365:1771-80.

Fred I. H., Heuvelink A. E., and Leong N. 2009. Geographical association between livestock density and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. Epidemiol.Infect.,30:1-7.

Fritz, C. A., Pellino C., AFlagler M. J., Strasser J. E., and AWeiss A. 2015. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. Infect. Immun., 79:1329-1337.

Fritz H., Kurt A., Eckert J., Rolf M. 2005. Medical Microbiology. Thieme Stuttgart ! New York. Cell.Microbiol.,10:54-58.

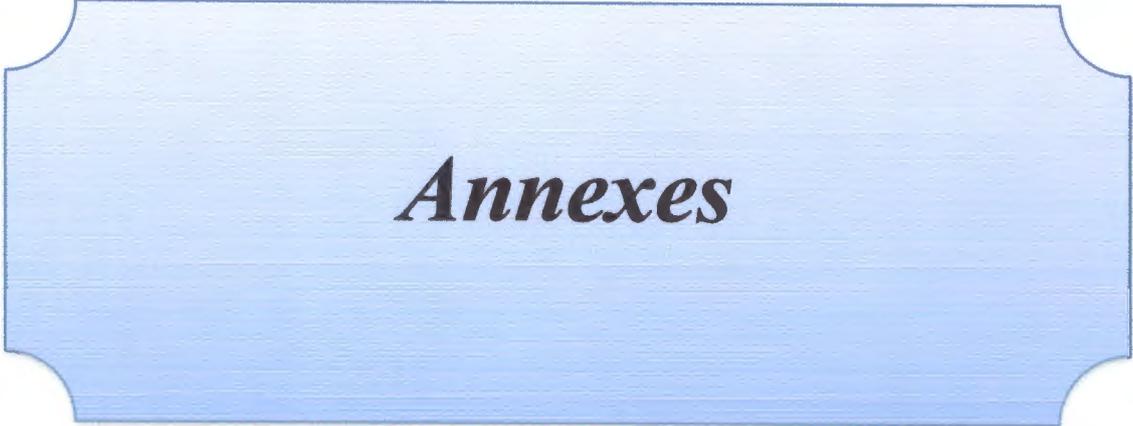
- Garcai P., Teerling C., Masri S. A., Gyles C.L. 1996.** Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J. Gen.Microbiol.*,**136**:1125-1135.
- Greatores N., Thorme G. 1994.**Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene.*J. Clin.Microbiol.*,**33**:1375-1377.
- Guiraud J.P. 2003.**Microorganismes intervenant dans l'industrie alimentaire .Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris.,p : 80-85.
- Guyer, D. M., Radulovic S., Jones F. E., Mobley H. L. 2002.** Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect. Immun.*,**70**:4539-4546.
- Hacker, J., Kestler H., Hoschutzky H., Jann K., Lottspeich F., Korhonen T. K. 2000.** Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infect. Immun.*,**61**:544-550.
- Hamon M. A., Batsche E., Regnault B., Tham T. N., Seveau S., Muchard C. t, Cossart P. 2007.** Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc. Natl. Acad.Sci U S A.*, **104**:13467-13472.
- Herlax H., Mevius D., Veldman K., Olesen I., Aarestrup F. M. 2005.** beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J.Antimicrob.Chemother.*, **56** :115-121.
- Homburg M., Sun J., Griener T. P., Mulvey G. L., Klassen G. L., Donnenberg M. S., Armstrong G. D. 2007.** The bundle pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell.Microbiol.*, **10**:177-187.
- Hull R. A., Gill R. E., Hsu P., Minshew B. H., Falkow S. 1981.** Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.*, **33**: 933-938.
- Jann K., Jann B. 1992.** Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can. J.Microbiol.*, **38**: 705-710.
- Johnson, J. R., Murray A. C., Gajewski A., Sullivan M., Snippes P., Kuskowski M. A., Smith K. E. 2003.** Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. *Antimicrob.Agents.Chemother.*, **47** : 2161-2168.
- Kang M. Stathopoulos C. 2004.** Functional analysis of the Tsh autotransporter

- Putze K. G., Young T, Beattie S, and Todd W. 2009.** Clinical surveillance of thrombotic microangiopathies in Scotland, 2003-2005. *Epidemiol. Infect.*, **136**:115-121.
- Russo T. A., Johnson J. R. 2000.** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.*, **181**:1753-4.
- Roland H. A., Perez-Conesa C., Doane B., Gillespie J., Oliver P., Pangloli B., Draughon F. 2006.** Genetic characterization of a diverse *Escherichia coli* O157:H7 population from a variety of farm environments. *Foodborne. Pathog. Dis.*, **3**:259-265.
- Robesto L., Remis S., Helgerson H., Johnson N., Hargrett P., Cohen M. L. 1988.** Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *N. Engl. J. Med.*, **308**:681-685.
- Ramos F., Feierl H., Galler D., Haas E., Melkes J., Posch I., Winter G., Marth E. 2010.** ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water. Research.*, **44**:1981-1985.
- Sylvie C. 2009.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Le parrain âge des antimicrobiennes.*, **42**:7.
- Sabate M., Prats G., Moreno A., Balleste A., Andreu A. 2008.** Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res. Microbiol.*, **159**:288-293.
- Stamm W. E., Norrby S. R. 2001.** Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J. Infect. Dis.*, **1**:1-4.
- Stenutz R., Weintraub A, Widmalm G. 2006.** The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *Microbiol. Rev.*, **30**:382-403.
- Stanford A. I., Kalman D. 2008.** Cytosolic extract induces Tir translocation and pedestals in EPEC-infected red blood cells. *PLoS. Pathog.*, **4**:4.
- Tiba M. R., Yano T., Leite D.S. 2008.** Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, **50**:255-260.
- Timothy A. E., Caprioli A., Minelli F., Gianviti A., Petris., Edefonti G., Rizzoni G. 2009.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**:106-108.
- Torres O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. 2010.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**:207-217.

Vallance B.A., Chan C., Robestson M.L., finlay B.B. 2002. Enteropathogenic and enterohemorragique *Escherichiacoli*infection : Emerging themes in pathogenesis and prevention.C. an. J. Gastroenterol., **16(11)**: 771-778.

Wiles T.J., Kulesus R. R., Mulvey M.A.2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic*Escherichia coli*. Exp. Mol.Pathol.,**85**:11-9.

Yang C. M., Lin M. F., Liao P.C., Yeh H.W., Chang B. V., Sung C. H.,Liou M. L. 2009. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical andsewage isolates in a regional hospital in Taiwan. Lett. Appl. Microbiol.,**48**:560-565.



Annexes

Annexe I : les milieux de culture, les géloses et les réactifs

1.1 .Milieux de culture :

1.1.1. Milieux solides :

Mueller Hinton Agar

pH final = 7,2-7,4

Gélose Héктоén

pH=7.6

Gélose nutritive

pH=7

Milieu TSI

pH=7.4

Milieu Mannitol-mobilité

pH =8.1-8.2

Milieu Urée- Indole

pH=7

1.1.2. Milieux liquides :

Bouillon nutritif

- Tryptone 10g
- Extrait de viande 5g
- Chlorure de sodium 5g

Milieu ODC

- L-ornithine (mono chlorhydrate) 5g
- Extrait de levure 3g
- Chlorure de sodium 5g
- Glucose 1g
- Bromo crésol pourpre 1ml
- Eau distillée 1L

Milieu ADH

- L-arginie (mono chlorhydrate) 5g
- Extrait de levure 3g
- Chlorure de sodium 5g
- Glucose 1g
- Bromo crésol pourpre 1ml
- Eau distillée 1L

Milieu LDC

- L-lysine (mono chlorhydrate) 5g
- Extrait de levure 3g
- Chlorure de sodium 5g
- Glucose 1g
- Bromo crésol pourpre 1ml
- Eau distillée 1L

Les réactifs :

Eau physiologique

- Chlorure de sodium 9g
- Eau distillée 1000g

Annexe II : résultat des différents tests microbiologiques

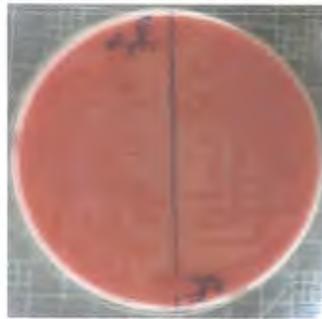


Figure 6 : la vérification de la pureté des souches d'*Escherichia coli* sur gélose héктоen

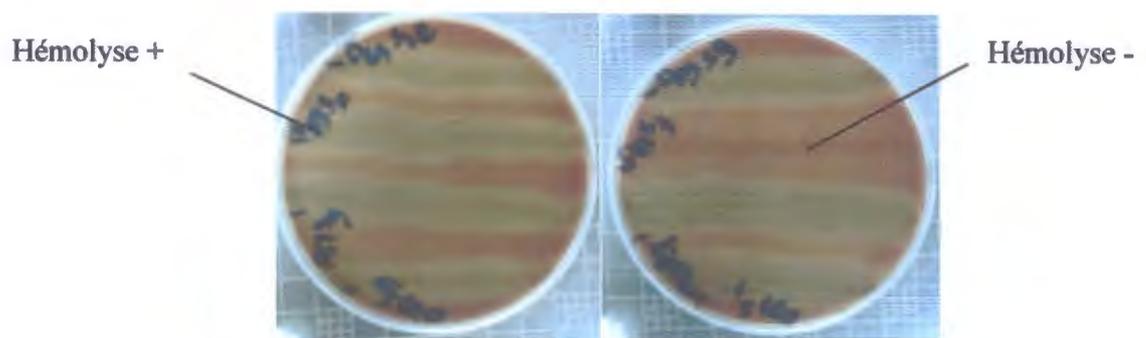


Figure 7 : recherche de pouvoir hémolytique.

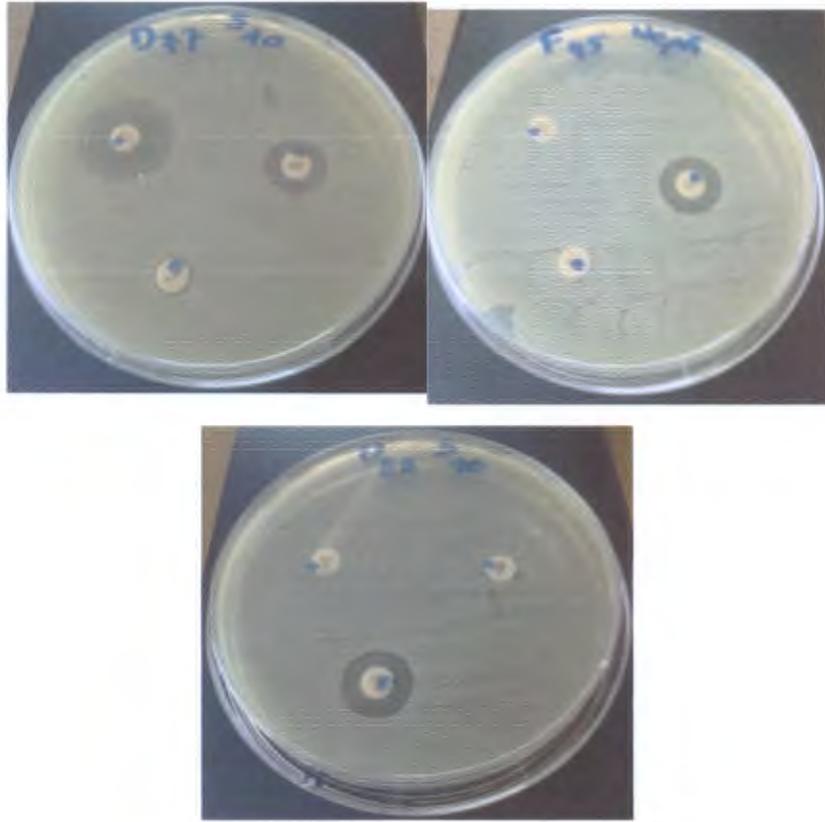


Figure 8 :Résultat de test de sensibilité aux antibiotique des souches d'*Escherichia coli*

Annexe III : tableaux des résultats des différents tests .

Tableau 09: Liste des antibiotiques Testés.

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Code	Charge
béta lactamines	Amoxicilline	AML	25
Aminosides	Streptomycine	S	500
béta lactamines	Pénicilline	P	
<u>polymyxines</u>	Colistine sulfate	CT	50

Présenté par Bouchenak Meriama Chouat Razika	Encadré par Dr.Boudjerda Dj.	Soutenu le 30/06/2016
---	--	------------------------------

Le thème: Exploitation des travaux de recherche sur la virulence et antibiorésistance de souches d'*Escherichia coli* isolées chez une population plus de 50ans d'âge

Résumé

Le screening des gènes de virulence (*clbN*, *sfa/focDE*, *cnf*, *kpsMT(k1)*, *papEF*, *hlyA*, *hlyF*, *afa/draBC*, *f17*) a été effectué sur une 41 souches d'*Escherichia coli* fournie par le laboratoire phytopharmacologie et phytochimie. Les résultats de screening a révélé la prédominance de la colibactine (92.69%) et d'autres gènes de virulence *sfa/focDE* (73.17%), *cnf* (53.66%), *kpsMT(k1)*(44%). En se basant sur les résultats du screening des gènes de virulence nous avons pu établir 19 patterns différents.

Le teste de sensibilité aux antibiotiques a été effectué sur 50 souches d'*Escherichia coli* fournies par le Laboratoire de phytopathologie phytochimie (LPP) et 10 souches fournies par le laboratoire centrale de l'hôpital de Taher, notre travail a révélé que le taux de résistance des souches fournies par le laboratoire de phytopathologie et phytochimie plus élevé par rapport aux souches de l'hôpital de Taher.

Mots clés: *E. coli*, screening, gène de virulence et antibiorésistance

Abstract

The screening of genes of virulence (*clbN*, *sfa/focDE*, *cnf*, *kpsMT(k1)*, *papEF*, *hlyA*, *hlyF*, *afa/draBC*, *f17*) was performed on a 41 strains of *Escherichia coli* supplied by the laboratory phytopharmacology and phytochemistry. The results of screening revealed the prevalence of the colibactine (92.69%) and other virulence genes *sfa/focDE* (73.17%), *cnf* (53.66%), *kpsMT(k1)* (44%). Wille basing itself on the results of the screening of genes of virulence we could establish 19 different patterns.

The tests of antibiotic susceptibility was performed on 50 strains of *Escherichia coli* supplied by the Laboratory phytopharmacology and phytochemistry (LPP) and 10 strains supplied by the central laboratory of the hospital Taher, our work revealed that the rate of resistance strains supplied by the laboratory phytopharmacology and phytochemistry higher compared to the strains of Taher hospital.

Keywords : *Escherichia coli*, screening, virulence genes and antibiotic Resistance.

الملخص

تم فحص الجينات الفيروسية التي أجريت على 41 (*clbN*, *sfa/focDE*, *cnf*, *kpsMT(k1)*, *papEF*, *hlyA*, *hlyF*, *afa/draBC*, *f17*) سلالة من نوع اشيريشيا كولاي مقمنة من طرف مخبر علم الصيدلة التجريبي والكيمياء النباتية. كشفت نتائج التحجس أن غالبية الجينات من نوع colibactine (92.69) وجينات أخرى (*sfa/focDE* (73.17), *cnf* (53.66), (*kpsMT(k1)* (44). وبناءا على نتائج فحص الجينات الفيروسية تحصلنا على 19 نمطا مختلفا.

تم إجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية في 50 سلالة من نوع اشيريشيا كولاي التي يقدمها مخبر علم الصيدلة التجريبي و الكيمياء النباتية و 10 سلالات من طرف المخبر المركزي للمستشفى الطاهير، كشفت علنا أن معدل المقاومة سلالاتنا مخبر علم الصيدلة التجريبي والكيمياء النباتية أعلى مقارنة مع سلالات المخبر المركزي لمستشفى الطاهير

الكلمات المفتاحية: اشيريشيا كولاي, الجينات الفيروسية و المقاومة البكتيرية