

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de fin des études supérieures (D.E.S)
En Biologie

OPTION
Microbiologie

THEME

**Les résultats des nouvelles techniques utilisées dans la
détermination de la pathogénicité de certaines
*Escherichia coli***

Soutenu le: 20 /06/2007

Devant le Jury:

Rapporteur : M^{elle} S. Akroum

M.A

Univ. JIJEL.

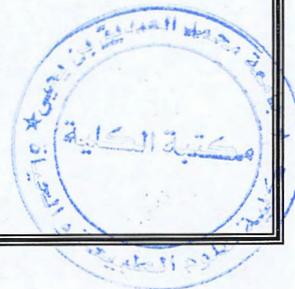
Examineurs : M^{elle} S. Laggoune

M.A.C.C

Univ. JIJEL.

Réalisé Par :

Guettou Chafia
Bousbia Ghalya
Khelalfa Keltoum



MB. 06/07

02
02

REMERCIEMENTS

Nous remercions en premier lieu DIEU tout puissant qui nous avoir donné la bonne foi et le courage pour accomplir ce modeste travail ainsi que nos parents.

L'aboutissement à la réalisation d'un travail est le fruit de toutes les années de formation, c'est donc à tous nos enseignants que nous voudrions d'abord exprimer notre respect et notre gratitude.

Nos sincères remerciements d'abord à notre prometteur S. AKROUM, M.A a l'université de Jijel qui a suivi l'évolution de ce travaille, surtout pour son aide précieuse, nous tenon à lui exprimer notre profonde gratitude et reconnaissance.

Nous tenon à remercier également M^{elle} S. LAGGOUNE, M.A.C.C a l'université de Jijel, avec l'expression de notre sincère reconnaissance d'avoir accepter de jury notre travail.

Nous adressons nos vifs remerciements à nos amies pour leurs encouragement chacune de son nom.

*Chafia,
Ghalya,
KeLtoum.*



Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I :

I- Représentation et infections dues à <i>E. coli</i>	2
I-1 Représentation de <i>E. coli</i>	2
I-2 Les infections dus aux différentes souches pathogènes d' <i>Escherichia coli</i> :	6
I-2-1 - Les infections intestinales	6
2-1-1 - Les souches entéropathogènes ou « <i>Entéro – Pathogenic E.coli</i> » (<i>E.P.E.C</i>)	6
2-1-2- Les souches entéro invasives ou « <i>Entero-invasive E.coli</i> » (<i>E.I.E.C</i>).....	7
2-1-3- Les souches entérotoxigènes ou « <i>Entero-Toxigenic E.coli</i> » (<i>E.T.E.C</i>).....	7
2-1-4- Les souches entérohémorragiques ou « <i>Entero-Hemorrhagic-Colitis E.coli</i> » (<i>E.H.E.C</i>)	9
I-2-2-les infections extra-intestinales	10
2-2-1- Les infections de l'arbre urinaire.....	10
2-2-2- Les infections génitales	13
2-2-3- Méningites néonatales est les septicémies (NMEC)	13

Chapitre II :

II- Les anciennes techniques	15
II-1- Les tests métaboliques (biochimiques)	15
II-2- Les techniques immunologiques	18
II-3- Les techniques de la biologie moléculaire	19

Chapitre III :

III- les avancées apportées par les nouvelles techniques	22
III-1-Les Nouvelles techniques	22
III-1-1-PCR (polymérase Chain réaction) c'est-à-dire réaction de polymérisation en chaîne	22
III-1-2-Les trousses commercialisées	23
III-1-3-Les puces à ADN, Puces à gène, Bio puce.....	24
III-1-4-Ribotypie.....	24
III-1-5-Électrophorèse en champs pulsés	25
III-1-6- PCR-ribotyping.....	25
III-2- l'utilisation des nouvelles techniques pour la détection des gènes pathogénicité.....	26
III-2-1-Extraction de l'ADN par des Kits.....	26
III-2-2-Serotypage moléculaire	26
III-2-2-a-Typage moléculaire de l'antigène somatique O	26
III-2-2-b-Typage moléculaire de l'antigène flagellaire H.....	27
III-2-3-Détection des gènes de pathogénicité <i>Stx</i> codant pour une shiga-toxine chez <i>E.coli</i> avec le système PCR de Lin et Bastien.....	28
III-2-4-Détection des gènes de la B- glucuronidase (B-glu), D'attachement (eae A) Et d'adhérence aggrégative (aaf/1) par un système PCR multiplex EAA-B	29
III-2-5-Détection des gènes de pathogénicité <i>bfp</i> codant le « bundle forming pili » chez <i>Escherichia Coli</i> par le système PCR.....	30
III-2-6-Détection des gènes des adhésines fimbriales P .A et S (pap, sfa, et afa)....	30

Chapitre IV :

IV-Les solutions apportées par les nouvelles techniques.....	31
IV-1- Connaître et déterminer des différents gènes et leurs fonctionnements	31
IV-2-Mutations	31
IV-3-Réparation des dommages à l'ADN (réparation des misappariement)	34

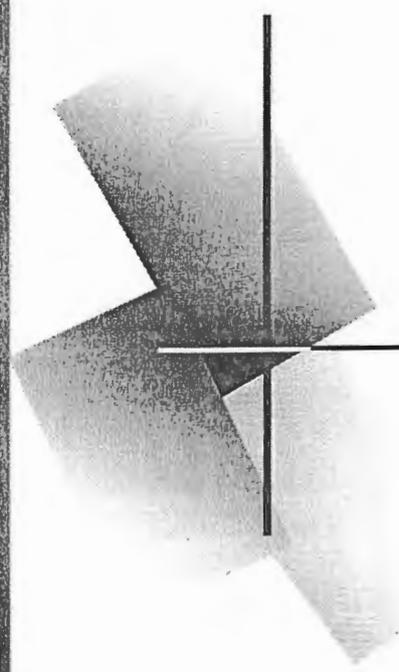
Chapitre V :

V- Discussion	35
----------------------------	-----------

VI- Conclusion	37
-----------------------------	-----------

Annexes

Bibliographie



Introduction

Introduction :

L'émergence des techniques de la biologie moléculaire dans la quasi-totalité des disciplines biologiques a marqué cette fin de siècle. La biologie moléculaire regroupe un ensemble de techniques basées sur l'étude, la détection et la modification des acides nucléiques donnant ainsi des succès éclatants tels que le clonage, l'amplification et les mutations des gènes. Le travail des laboratoires de bactériologie clinique repose sur l'isolement, l'identification de l'agent pathogène et l'étude de la résistance aux agents antibactériens (Durand G., Frezet S., 2002-2003).

Les méthodes dites traditionnelles comprennent l'examen direct, la culture et l'identification ainsi que la phénotypie alors que la bactériologie moléculaire repose sur la mise en évidence d'acides nucléiques bactériens et la génotypie.

Selon le germe en cause, le délai de réponse peut prendre plusieurs jours, voire des semaines ou même des mois. Le traitement est donc souvent instauré uniquement sur les données cliniques sans l'aide du diagnostic bactériologique.

En 1980, MOSELEY et coll. ont été les premiers à utiliser l'hybridation ADN-ARN pour la détection d'*Escherichia coli* entérotoxigènes isolées des selles (Durand G., Frezet S., 2002-2003).

E. coli est un hôte normal de la flore intestinale. De ce fait, l'industrie agroalimentaire est un bon indicateur de contaminations féco-orales. Cependant certains sérotypes ou sérogroupe de cette espèce peuvent être pathogènes, ils peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires et plus gravement de syndromes hémolytiques et urémiques.

Les nouvelles études sont chargées de caractériser les *E. coli* pathogènes, de détecter leurs gènes de pathogénicité et de participer à l'investigation des phénomènes épidémiques. Cela s'effectue tout d'abord grâce à la sérotypie à l'aide de sérum, au sérotypage moléculaire permettant de déterminer les sérotypes, puis par la recherche de gènes de pathogénicité qui permettent de définir le pathovar d'*E. coli*.

Les techniques de PCR, de ribotypie et, qui sont des marqueurs épidémiologiques permettent une identification moléculaire plus précise contribuant à des analyses épidémiques plus poussées (Tap J., 2004).

Chapitre I

Réprésentation et infections dûes à E. coli

I- Représentation et infections dues à *E. coli* :**I-1 Représentation de *E. coli* :****1-1-Historique**

Le genre *Escherichia* a été dénommé d'après le médecin Allemand Theodor ESCHERICH (1857-1911) qui, en 1885 publia ses travaux sur un court bâtonnet à Gram négatif à l'extrémité arrondie, présente dans les matières fécales et l'intestin de l'enfant. (Mainil J., 2003)

Escherichia coli est l'espèce bactérien qui a été la plus étudiée par les fondamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique cette bactérie est connu depuis longtemps comme comensale de tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire, au cours de dernière décennies, le rôle de certains catégories d' *E. coli* dans syndromes diarrhéiques a été précise et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analyses. (Avril J L et al. , 1992).

1-2-Définition:

E. coli ou "colibacille" est une bactérie (bacille) a gram négatif appartenant a la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Escherichia*.(A).

Elle mesure environ 2 μ (microns ou micromètres) et pèse 10^{-12} g c'est une cellule sans noyau véritable,mais possédant dont tous les éléments nécessaires a la synthèse des protéines,c'est- a- dire un chromosome de 1mm de long, comportant environ 4000gene et de nombreux ribosomes dans le cytoplasme. (A ; Prescott L M., 2003).

Dans les conditions optimales, chaque cellule se divise en deux tous les 20 minutes environ, c'est ainsi qu'en moins de deux jour, une quantité suffisante de nourriture, une masse 6×10^{21} tonnes, égale a celle de la terre la mort d'*E. coli* nécessite 10 grays. (Bousseboua H., 2002 ; A).

L'espèce *E. coli* est constitue d'une multitude de souches qui peuvent être différencier et classé par la détermination de leur Biotypes, Serotypes et Lysotypes. (Mainil J., 2003).

Elle se développe de PH4, 3a 9 avec un optimum compris entre 6-8.

Elle est attaque par les phages de la série T qui sont appelés coli phages.(Bousseboua H., 2002).

1-3-Classification d' *E. coli*: (Bousseboua H., 2002)

Règne: *Procaryotae*

Division: *Gracilicutes*

Classe: *Scotobacteria*

Ordre: *Eubacteriales*

Famille: *Enterobacteriaceae*

Genre: *Escherichia*

Espèce: *Escherichia coli*

1-4-Ecologie :

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud habituellement présente dans le gros intestin (représente près de 80% de la flore intestinale aérobie de l'adulte) et non pathogène, elle peut cependant le devenir lorsqu'elle envahit les voies urinaires.

On peut les retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez les animaux. Le nouveau-né est ensemencé lors de l'accouchement par contact avec la flore cutanée, périnéale qui provient de la flore fécale ce micro-organisme peut aussi vivre à l'état libre, en particulier dans les eaux évacuées des selles (représentent à raison de 10^7 à 10^9 corps bactériens par gramme de selles), il circule dans les égouts et peut polluer les eaux qu'il rend non potables, voire impropre à baignade des prélèvements réguliers sont effectués dans les piscines et au niveau des plages pour détecter sa concentration (Avril J L. et al. , 1992 ; Prescott L M. et al. , 2003 ; B).

1-5-Caractères culturels :

Les souches de *E. coli* sont des souches aérobies anaérobies facultatifs, elles cultivent facilement sur les milieux à une température optimale de 37°C et un pH optimum de 7. Leur vitalité est sensible à l'action de la chaleur (tuées en un hour à l'acide phénique en solution 1%). (Moustardier G. , 1972).

On les conserve très facilement en culture à 4°C. elles ne sécrètent pas de toxines solubles, mais elles ont une endotoxine (antigène O) qui présente les caractères de celle des entérobactéries (Moustardier M., 1972).

-En bouillon nutritif: trouble homogène abondant avec une onde ondulée et dépôt grisâtre parfois léger voile en surface.

-Sur gélose nutritive: colonies arrondies, de couleur blanchâtre ou le germe jaunâtre.

-sur milieux sélectifs:

- ✓ -Colonie de coloration rouge brique.
- ✓ -Colonie épaisses et brillantes jaune verdâtre sur milieu de kristensen.
- ✓ -Colonie petits violets foncés avec reflet métallique sur milieu à l'éosine bleu de méthylène de Levine.
- ✓ -Colonies plates:
 - Rose saumon sur Hektoen.
 - Jaunes sur gélose lactose au bromocrésol pourpre (BCP).
 - Rose sur MacConkey.
- ✓ -Colonies petites de couleur violette sur l'endo (avec reflet métallique). (Moustardier M., 1972).

1-6-Caractères biochimiques (Leminor L., Verron M., 1982)

Mobilité	+	Légende :
Lactose	+	
Test ONPG	+	LDC: Lysine décarboxylase
Nitrate	-	ODC: Ornithine décarboxylase
H ₂ S	-	ADH: Argénine Dihydrolase
LDC	d	TDA, PDA]: des aminases du tryptophane Et de phénylalanine
ODC	d	
ADH	d	
Uréase	-	
TDA, PDA	-	
Indole	+	ONPG: Ortho-nitro-phenyl-
Citrate de Simmons	-	B-D-glactopyranoside.
Malonate	-	
VP	-	VP: Voges-proskauer
RM	+	RM: Rouges de Méthyle
TTR	-	TTR: Tétrathionate réductase
Gélatinase	-	
Gaz/ Glucose	+	
Mannitol	+	d: différents type biochimiques
Rhamnose	d	x: tardivement et irrégulièrement
Saccharose	d	positif ou négatif
Inositol	-	+: positif en 24 h
Adonitol	-	- : négatif en 24h
Oxydase	-	
Catalase	-	
Nitrite (No ₂)	+	

1-7-Caractères antigéniques:

Les *E. coli* possèdent une structure antigénique complexe avec trois variétés d'antigènes: somatique (O), flagellaire (H) et d'enveloppe ou de surface (K) (Moustardier M., 1972).

a- Antigènes somatique O:

Sont des lipopolyosides complexe de la membrane externe des *E.coli*, la spécificité de antigène O est donnée par les séquences répétitives de polyoside, il existe environ 160 antigène (O) différents Au moyen d'immunosérums spécifique, il est possibles de classer serologi-quement les souches de l'*E.coli* dans les groupes O les antigènes (O) sont thermostables ne sont pas détruits par l'alcool, mais le sont par le formol (Moustardier M., 1972).

b- Antigènes flagellaires H:

Généralement peu abondant, la diversité antigénique des flagelles dépend de Celle de la protéine de base, la flagelline les antigènes H différents, qui agglutinent les germes qui les possèdent (Moustardier M., 1972).

c- Antigènes capsulaires K:

Ce sont principalement des polyosides acides, et ils ont été initialement divisés en trois types A, B ou L, ils recouvrent les antigènes (O), les masquent et rendent les germes correspondant inagglutinables par les sérums anti-O (Moustardier M., 1972).

1-8-Antibiogramme :

On peut effectuer des tests pour déterminer la sensibilité d'un agent pathogène à une série d'antibiotiques. Le profil des sensibilités d'une souche donnée s'appelle un antibiogramme. Les résultats de tels tests peuvent permettre au clinicien de choisir le ou les antibiotiques les plus actifs pour la chimiothérapie. La méthode des disques (diffusion) est un type de test très utilisé. Une boîte de milieu gélosé adéquat est ensemencée avec une culture pure de l'organisme pathogène. L'inoculum est étalé sur toute la surface du milieu, de manière à ce qu'une croissance quasi-confluente se développe lors de l'incubation. Avant de mettre à incuber, on dépose sur le milieu ensemencé, en différents endroits de la boîte. Plusieurs petits disques de papiers absorbants imprégnés chacun d'un antibiotique différent pendant l'incubation, l'antibiotique diffuse à partir de chaque disque. Si l'organisme est sensible à un antibiotique donné, une zone d'inhibition de croissance apparaît au tour du disque contenant cet antibiotique. Il est nécessaire de standardiser les méthodes : la présence ou la dimension d'une zone libre de croissance ne peut être interprétée correctement que si toute la procédure a été standardisée (Singleton P., 1999).

1-9-Les antibiotiques et leurs sites d'action dans la bactérie (*E. coli*):**a- Antibiotiques agissant au niveau de la paroi:**

- Les Bêta-lactamines (pénicilline et céphalosporines) inhibent la synthèse de la paroi.
- La vancomycine bloque le transport des substrats vers leur site d'insertion dans la paroi (Moustardier M., 1972).

b- Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique:

-les Polymyxines agissent contre beaucoup de bactéries G⁻, ces antibiotiques se fixent entre les 02 feuillets de la membrane et permettent la fuite du contenu cellulaire, et donc modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique et endommagent la membrane externe (Singleton P., 1999).

c- Antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines:

- les macrolides et les phénicolones : agissent au niveau de la fraction 50s du ribosome et bloquent l'élongation de la chaîne protéique au cours de la synthèse.
- les aminosides: agissent au niveau de la fraction 30s, provoquent des erreurs de la lecture de l'ARN, entraînant une perturbation de la synthèse des protéines (Moustardier M., 1972).

d- Antibiotiques agissant au niveau de l'information génétique:

Il agit plusieurs stades de la transcription du code génétique:

- réplique de l'information génétique, c'est le cas de nalidixique
- transcription de l'information génétique, c'est le cas de l'actinomycine (Moustardier M., 1972).

I-2 Les infections dus aux différentes souches pathogènes d' *Escherichia coli* :

Les premières distinctions faites entre les différentes souches pathogènes ont été basées sur leur tropisme clinique, permettant de séparer les souches à tropisme intestinal de celles à tropisme extra intestinal.

Par la suite, ces dernières furent à leur tours subdivisées en souches uropathogènes responsables d'infection du tractus urinaire, en souches néonatal meningitis responsables de la méningites néonatales dans 80% des cas et en souches invasives, responsables d'infections d'organes internes (Mainil J., 2003).

I-2-1 - Les infections intestinales :**2-1-1 - Les souches entéro-pathogènes ou «Entéro - Pathogeni *E.coli*» (*E.P.E.C*) :**

Elles étaient responsables, dans les années 50, de diarrhées infantiles graves ou toxiques servant par épidémies dans des crèches ou des maternités. ces souches encore appelées *E.coli* G.E.I sont plus rarement rencontrées aujourd'hui, elles appartiennent à des sérotypes particuliers : o111, o26, o55, o86, o125, o119, o127, o126, o128 (Avril J L. et al., 1992).

1-Manifestation clinique :

Les souches EPEC sont responsables de diarrhées aqueuses et de gastro-entérites infantiles, causant la mort de nombreux nourrissons de moins de deux ans et entraînaient une diarrhée sévère avec vomissement et déshydratation aiguë (Leminor L. Verron M., 1982).

2-Facteurs de virulences :

Pili en faisceaux «BFP» (bundle - forming pilus) codés par l'opéron *bfp*, situé sur un gros plasmide EAF de 95 kpb. Le BFP fait partie des pili de type IV. L'opéron *bfp* est composé de 14 gènes et son expression est régulée par le promoteur *bfpA* (Tap J., 2004).

Une protéine de membrane externe de 94 K DA appelé : l'intimine codée par le gène *eae*, située sur un îlot de pathogénicité du chromosome le LEE qui est composé de 41 gènes incluant le gène *ett2* codant un système de type III. Dont la présence de l'intimine est un facteur de virulence de EPEC, il provoque la réorganisation du cytosquelette. (Tap J., 2004).

Ces souches ne produisent généralement ni ST ni LT, elles possèdent une toxine désignée comme verotoxine VT (Avril J L. et al., 1992).

3-Physiopathologie :

La première étape d'interaction entre la bactérie et les cellules hôte est une adhésion localisée (LA) sous forme de petites amas bactérien très serrés par l'intermédiaire de pili «BFP». Après la fixation, EPEC forment sur muqueuse intestinale ce qu'on appelle les des lésion d'attachement et effacement (A/E). La formation de (A/E) due à une protéine de membrane externe appelée l'intimine qui provoque l'attachement de *E.coli* aux cellules épithéliales.

La pathologie par les lésions (A/E) est caractérisée par une forte adhérence de la bactérie sur les entérocytes par l'effacement des microvillosités (MV) et la destruction

du cytosquelette de la cellule affectée. Dans la zone en contact étroit avec la bactérie, une forte condensation de filaments d'actine est observée. Il s'en suit une activation de la protéine kinase C provoquée par l'augmentation d'ion calcium dans les entérocytes. Ces mécanismes provoqueraient une diarrhée due à une perte de capacité d'absorption entérocytes et à une hypersécrétion d'ion (Tap J., 2004).

2-1-2- Les souches entéro invasives ou « *Entero-invasive E.coli* » (E.I.E.C) :

Elles sont isolées de syndrome dysentérique tant chez l'adulte que chez l'enfant. Le pathovar (EIEC), rare ou moins connu, concerne des sérotypes particuliers comme O28 : h-, O124 : h30. Les EIEC constituent ainsi le lien entre les *Shigella* et les *E.coli* du point de vue taxonomique (Avril J L. et al., 1992 ; Tap J., 2004).

1-Manifestation clinique :

Ces bactéries causent un syndrome dysentérique identique à celui des *Shigella*. La symptomatologie est la même que celle de la dysenterie bacillaire : fièvre, diarrhée avec sang, mucus et pus dans les matières fécales (Leminor L., Verron M., 1982).

2-Facteurs de virulences :

Quelques-uns au moins des gènes de virulence se trouvent sur le plasmide *pInv*. EIEC code pour une protéine fonctionnellement analogue à l'IcsA de *S.fleneri* et produit au moins une entérotoxine codée par un plasmide : ShET2. Certains des gènes de virulences d'EIEC sont régulés par la température (Singleton P., 2005).

3-Physiopathologie :

Le mécanisme du pouvoir pathogène est identique à celui des *Shigella*. Les EIEC envahissent la muqueuse colique, car elle est phagocytée par les cellules épithéliales à la suite d'une interaction spécifique entre la cellule et la bactérie. Les bactéries adhèrent, disloquent la bordure en brosse et sont internalisées dans une vacuole cytoplasmique qu'elles lysent rapidement, pour se multiplier librement dans le cytoplasme de ces cellules. Après cette phase de multiplication, les bactéries provoquent une réaction inflammatoire intense avec des micro abcès dans la muqueuse. Cela entraîne la mort cellulaire (Berche P. et al., 1988).

2-1-3- Les souches entérotoxigènes ou « *Entero-Toxigenic E.coli* » (E.T.E.C) :

Habituellement véhiculé par la nourriture ou l'eau, ETEC est une cause fréquente de diarrhée chez les enfants, il est aussi régulièrement responsable de la diarrhée du voyageur. Les ETEC appartiennent à des sérotypes :

O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O148, O159 (Avril J L et al., 1992 ; Singleton P., 2005).

1-Manifestation clinique :

Ces diarrhées ont comme caractéristique d'être aqueuses, cholériformes, de causer une déshydratation sans qu'il y ait de lésion histologique au niveau de l'intestin (Berche P. et al., 1988).

2-Facteur de virulences :

Le pouvoir pathogène des ETEC est lié à deux facteurs de virulences :

a- Les adhésines :

Le plus souvent constituées de pili qui permettent aux bactéries d'adhérer aux cellules de la muqueuse intestinale. On peut en distinguer plusieurs types : CFA/I, CFA /II, CFA/III . (Avril J L. et al ., 1992 ; Singleton P., 2005).

b-Les endotoxines :

Les souches d'ETEC peuvent produire deux types d'entérotoxines : des toxines thermostables (STa, STb / ST-I, ST-II) et des toxines thermolabiles (LT-I, LT-II) : (Singleton P. , 2005).

b-1 - L'entérotoxine LT, thermolabile :

C'est une protéine inactivée par un chauffage à 60°C, sa structure et son mécanisme d'action très voisins de ceux de la toxine de *Vibrio cholerae* .La sous unité A stimule l'adénylate cyclase en augmentant la concentration d'AMP cyclique des entérocytes. La sous -unité B est responsable de sa fixation qui élève la concentration d'AMP cyclique intra-entérocytaire à un récepteur membranaire. Il y a deux types différents d'entérotoxines thermolabiles : (Avril J L et al. 1992).

- L'entérotoxine thermolabile LT-I:

Ressemble par sa structure et son activité, à la toxine du cholera, mais la maladie provoquée est généralement moins grave que celle due a la toxine cholérique. (Singleton P., 2005).

- L'entérotoxine thermolabile LT- II :

Atteint notamment les porcs, rarent l'homme (Singleton P., 2005).

b-2 -L'entérotoxine thermostable ST :

Elle est moins bien connue et plusieurs formes de l'entérotoxines ST existent. Elle est mise en évidence par l'accumulation de liquide après injection dans l'estomac du souriceau nouveau-né .elle stimule l'activité guanylate cyclase en augmentant le GMP cyclique entérocytes. (Avril J L. et al. ,1992).

-L'entérotoxine thermostable STa :

Est un peptide de 18-19 acides aminés. Se fixe à des récepteurs de membrane de la bordure en brosse, elle active ainsi la guanylate cyclase et augmente les teneurs intracellulaires GMP cyclique. On a pensé que cela stimulait la sécrétion de chlorure et l'absorption de NaCl, ce qui conduit à la sécrétion de liquide dans l'intestin. Une autre idée veut que la toxine interrompe le mécanisme d'acidification du lumen. (Singleton P., 2005).

L'entérotoxine thermostable STb :

Peptide de 48 acides amines, est formée surtout, mais pas seulement, par les souches porcines d'ETEC (Singleton P., 2005).

3-physiopathologie :

À l'instar delà toxine cholérique, la toxine LT stimule la formation de l'adénylcyclase membranaire qui accroît la concentration de l'AMP cyclique

intracellulaire .celle –ci à son tour se traduit par l'excrétion active d'ions $Cl-HCO$ et d'eau dans la lumière intestinale.

Des que l'entérotoxine s'est fixé sur l'entérocyte cette action est irréversible mais elle ne se prolonge pas plus de 20-24h.

Elle ne s'oppose pas a l'absorption d'eau et de sodium par l'entérocyte ; en particulier si l'on ajoute du glucose à la concentration 20-30 g/l dans la solution .C'est une propriété qui est utilisée pour la réhydratation orale lors des diarrhées cholériforme par les solution du glucose électrolytes (Acar J., 1983).

2-1-4- Les souches entéro hémorragiques ou «*Entero-Hemorrhagic-Colitis E.coli*» (E.H.E.C) :

Le terme EHEC décrit des souches de STEC qui ont été pathogène pour l'homme, L'émergence de ce pathovar commence à poser un problème de santé publique (Bouvet J. Vernozy-Rozand C., 2000).

Les EHEC sont maintenant connus pour être les principes agentes infectieux responsables des diarrhées hémorragique appelées : colites hémorragiques. En cas de complication, ils peuvent entraîner un syndrome hémolytique (SHU). Le sérotype principalement mis en cause est le O175 :H7 (Tap J., 2004).

La dose contagieuse minimale est apparemment inférieure à 100 cellules, il y a plus de 25 sérotypes de EHEC pathogène qui peuvent provoquer la maladie, mais a l'échelle du monde, c'est O175 :H7 qui est le plus souvent isolé lors de colite hémorragique (Singleton P., 2005).

1-Manifestation clinique :

La période d'incubation est normalement de 3 à 4 jours, mais des périodes de 5 à 8 Jours ou de 1 à 2 jours de ne sont pas existentielles. Les nourrissons et les enfants de moins de trois ans ainsi que les personnes âgées présentent un risque élevé de développer un syndrome hémolytique et urémique .Ce syndrome est caractérisé par une anémie due à une diminution de la durée de vie des érythrocytes un taux de plaquettes bas et une insuffisance rénale le taux de létalité est compris entre 2 et 7 % avec des lésions rénales ou neurologiques, ou de l'hypertension dans 12 à 30% de cas.

Le SHU peut évoluer rarement par un purpura thrombocytopénique thrombotique (TTP). Des séquelles rénales ou neurologiques peuvent subsister (Tap J., 2004).

2-Facteurs de virulences :

La virulence des EHEC est due à la production de toxines appelées «shiga-toxine», elles sont également appelées verotoxines (VT).

Ces toxines codés par les gènes *stxA* et *stxB*, il existe deux types de shiga-toxines Stx1 et Stx2 avec plusieurs variants (Stx2 c, d, e et f).les gènes *stx* sont d'origine phagique c'est-à-dire que la bactérie a été lysogénisée par un phage lui induisant la faculté de produire ces toxines.

Comme les EPEC les EHEC ont aussi le gène *eae*. Un autre facteur de virulence c'est la protéine E-hlyA (entéro hémolysine), codée par le gène d'origine plasmidique *E-hlyA* (Tap J., 2004).

3-Physiopathologie :

La virulence des EHEC est due à la production de shiga-toxine. Ces toxines ont un effet léthal sur les cellules nerveuses, entérocytes et rénal pouvant causer la mortalité

du patient. La protéine E-hlyA possède une activité cytolytique liée à la capacité de former des pores conduisant à la lyse des cellules cibles. Le gène *eae* permet de induire des lésions d'attachement et d'effacement (Tap J., 2004).

I-2-2-Les infections extra-intestinales :

2-2-1- Les infections de l'arbre urinaire :

Les *E. coli* sont les bactéries les plus souvent en cause dans les infections fréquentes de l'arbre urinaire.

Les bactéries qui, dans la vaste population des *E. coli* commensaux du tube digestif, possèdent des caractères qui les rendent aptes à coloniser la muqueuse de l'arbre urinaire sans être entraînées par le flot des urines, ils peuvent causer des infections au niveau de la vessie ou au niveau des reins.

L'infection à partir des *E. coli* fécal se fait le plus souvent par voie ascendante, parfois après pose d'une sonde qui introduit les contaminations dans la vessie.

Ces infections se produisent plus aisément chez la femme que chez l'homme.

Une autre voie possible de contamination de l'arbre urinaire est la voie lymphatique qui jouerait le rôle de relais entre le colon et l'arbre urinaire (Leminor L., Verron M., 1982).

Les UPEC sont les souches responsables de l'infection du tractus urinaire, ils appartiennent à un nombre limité de sérotypes : O1 :H4, O2 :H7, O4 :H5, O6 :H1, O75 :H5, O25 :H1 (Mariani-Kurkdjan P 2004).

1-Manifestation clinique :

Les symptômes d'une infection urinaire peuvent être isolés ou groupés en syndrome clinique évocateur :

- Les douleurs sont le plus souvent localisées dans l'aire des voies urinaires, accompagnées de brûlures mictionnelles, il existe aussi des douleurs permanentes, des douleurs lombaires unilatérales à type de tension, augmentées par la palpation entre les deux mains.
- Les troubles mictionnelles sont surtout des envies impérieuses ; On peut observer également une incontinence d'urines, chez l'enfant.
- La fièvre est très inconstante ; elle témoigne le plus souvent d'une atteinte du haut appareil ou de la prostate (Acar J F. et al. , 1983).

2-Facteurs de virulences :

Les souches responsables d'infection urinaire, possèdent des facteurs de virulence particuliers (Avril J L. et al. , 1992).

a. Facteurs d'uropathogénicité liés à l'adhésion :

L'adhésion spécifique s'effectue par l'intermédiaire de fimbriae ou pili qui sont des polypeptides spécifiques de récepteurs saccharidiques, présents à la surface des cellules eucaryotes. *E. coli* peut exprimer plusieurs types de fimbriae (Mariani-Kurkdjan P 2004).

- **Les fimbriae de type 1 :**

Sont codées par l'opéron *fim* (*fimA* à *fimL*). Le gène *fimH* code pour l'adhésine FimH qui se lie spécifiquement aux résidus D mannose qui tapissent les cellules

vaginales et les cellules vésicales. L'adhésion des pili de type 1 aux radicaux mannose présents à la surface des leucocytes favorise l'augmentation de phagocytose. Fimbriae de type 1 sont isolées des souches d'UPEC responsable de pyélonéphrites aiguës (Mariani-Kurkdjan P 2004).

- **Les fimbriae de type p :**

Les fimbriae de type P ont une morphologie différente : chaque fimbriae est formé d'une fibre hélicoïdale rigide en contact avec la surface bactérienne, et d'une fibre flexible pressente a l'extrémité de la fibre rigide.

Les fimbriae de type P sont codés par l'opéron **pap** (Pyelonephritis Associated Pili) ou par l'opéron **prs** ou **prf**.

L'opéron **pap**, porté par le chromosome bactérienne, comporte 11 gènes (pap A, pap), la protéine Pap. G, est responsable de la spécificité de l'adhésion des bactéries à leur récepteurs.

L'analyse génétique permet de différencier trois allèles : I, II, III. Les allèles de type III sont plus souvent retrouvés chez les souches responsables de cystites (Mariani-Kurkdjan P 2004).

- **Les adhésines de types S :**

Les adhésines de type S, associées à la présence de pili de type S, reconnaissent les résidus α -sialyl-[2,3]- β -galactoside présents sur les glycolipides de la surface cellulaire. Les S fimbriae apparaissent cependant plus fréquemment associés aux méningites néonatales qu'aux infections urinaires (Mariani-Kurkdjan P 2004).

b-Facteurs d'uropathogénicité non liés à l'adhésion :

Il s'agit de toxines et des systèmes de captation du fer : hly, cnf1 et de la résistance au pouvoir bactéricide du sérum (Leminor L., Verron M., 1982).

- **Résistance au pouvoir bactéricide du sérum :**

Les souches isolées de pyélonéphrites sont beaucoup plus résistantes que celles isolées de selles (Leminor L., Verron M., 1982).

- **Production d'hémolysine (hly) :**

Le caractère hémolytique est fréquent chez les *E.coli* isolées de pyélonéphrites. On ne sait pas comment agit cette propriété hémolytique. Elle peut augmenter localement l'invasivité dans le tissu rénal ou agir indirectement en augmentant la quantité de fer disponible pour les bactéries (Leminor L., Verron M., 1982).

- **Production de facteur cytotoxique nécrosant type 1(CNF1) :**

Est une protéine thermolabile de 114KDA, l'activité de la toxine vis-à-vis des cellules de mammifères sont due à une altération de la polymérisation de l'actine cellulaire (Denden I. et al. ,2004).

- **Possession d'un système chélateur du fer :**

Le fer est indisponible à la croissance des bactéries .La concentration de fer est de l'ordre de 10^{-18} M, beaucoup trop faible pour que les bactéries puissent croître, les bactéries telles que *E.coli* ont élaboré des ligands aptes à solubiliser et transporter le fer ,agent chélateur appelés siderophores (Lenor L., Verron M., 1982).

3-Physiopathologie :

Puisque les facteurs de virulence chez les EPEC sont nombreux et chacun à un mécanisme spécifique et pour ce la on propose un seul mécanisme celui des fimbriae de type 1.

La migration de *E.coli* le long des voies urinaires en dépit du flux urinaire requiert l'attachement de structure spécifique bactérienne sur des récepteurs à la surface des cellules épithéliales. L'adhésion spécifique s'effectue par l'intermédiaire de fimbriae. Entre 4 et 24 heures après la colonisation, l'environnement dans la vessie va sélectionner l'expression des fimbriae de type 1 en position «on».

Cette adhésion prévient l'élimination de la bactérie par le flux urinaire et déclenche l'apoptose, l'internalisation de la bactérie dans l'épithélium de la vessie, ce qui pourra être responsable de la rechute d'IU (Mariani-Kurkdjan P 2004).

Il y a deux types d'infections urinaires :

➤ *Les Cystites :*

Les cystites sont des atteintes infectieuses de la paroi vésicale. Ces infections surviennent avec une fréquence chez la jeune femme, sans aucune anomalie préexistante du tractus urinaire.

En effet, on estime que 10 à 20% des femmes jeunes présentent au moins un épisode de cystites de leur vie (Berche P. et al. , 1988).

- **Manifestation clinique :**

La maladie entraîne des douleurs sus- pubiennes et parfois de l'hématurie (présence de sang dans l'urine) et de fièvre, sont des infections descendant des reins ou montant de l'urètre (Berche P. et al. , 1988 ; Singleton P., 2005).

➤ *Les Pyélonéphrites :*

Une pyélonéphrite aigue se définit comme une inflammation aigue des cavités rénales d'origine bactérienne.

Souvent primitive, elle complique ailleurs une uropathie (Acar J., 1983).

- **Manifestation clinique :**

Les malades consultent généralement en urgence pour des douleurs lombaires et de la fièvre, la douleurs caractéristique et unilatérale, avec irradiations descendantes. Cependant des localisations atypiques, des atteintes bilatérales, ou même l'absence de douleurs sont possibles. La fièvre élevée est oscillant, les frissons, les malaises, l'atteinte de l'état générale évoquent un état septicémique (Acar J., 1983).

Les pyélonéphrites aigues sont des complications des cystites (Berche P. et al. , 1988).

2-2-2-Les infections génitales :

On distingue classiquement les infections génitales qui n'atteignent que les organes génitaux.

Les infections peuvent se présenter sous des aspects cliniques différents et selon le sexe on distingue (Berche P. et al. , 1988) :

a. Chez l'homme:

La principale infection génitale causée par *E.coli* est la prostatite.

▪ Manifestation clinique :

Une symptomatologie générale (fièvre) précède souvent l'apparition de troubles mictionnels. Un écoulement urétrale est souvent présent aussi qu'une douleur périnéale dans le bas du dos. Le prostate est augmentée de volume et sensible, voir très douloureuse. (Acar J., 1983).

b. Chez la femme :

Les infections pelviennes causées par *E.coli* sont les infections les plus fréquentes chez la femme. (Acar J., 1983).

Elles peuvent être divisées en :

➤ Les infections à la suite de traumatisme direct à la cavité utérine :

Se réalise lors d'un curetage, d'un avortement, d'un accouchement. Ces infections sont accompagnées ou non de signes systémiques (Acar J., 1983).

▪ Manifestation clinique :

Elles se manifestent par une douleur pelvienne plus ou moins importante et un écoulement vaginal souvent putride (Acar J., 1983).

➤ Salpingites : ou infection pelviennes :

Ce sont de loin les infection les plus fréquentes .Compiquant une infection génitale transmis sexuellement (Acar J., 1983).

▪ Manifestation clinique :

Les manifestations cliniques varient d'un cas à l'autre, le symptôme le plus fréquent est une douleur pelvienne basse, habituellement bilatérale. Les pertes vaginales, la fièvre, la présence d'une masse annexielle sont des signes inconstants. L'infection peut évoluer vers la formation d'abcès ou la stérilité (Acar J., 1983).

2-2-3-Méningites néonatales est les septicémies (NMEC):

Les méningites et les septicémies à *E.coli* surviennent surtout chez les nourrissons durant le premier mois de la vie.

Il est vraisemblable que la contamination des nouveaux nés se fait par la mère puisque 20 à40 % des adultes hébergent dans leur tube digestif des *E.coli* qui possèdent l'antigène K1 (Leminor L., Verron M., 1982).

1. Manifestation clinique :

Les signes cliniques chez les nouveaux nés et les arguments para cliniques avec, en particulier, une augmentation de la protéine C réactive (Bingen E., 1999).

Les méningites à *E. coli* causent un taux élevé de mortalités et laissent souvent des séquelles chez les survivants (Leminor L., Verron M., 1982).

2. Facteurs de virulences :

Parmi les facteurs de virulences connus chez *E. coli* (capsule, system captation de fer et l'adhésion) certains facteurs bactériens vont particulièrement contribuer au des différents étapes aboutissant à l'invasion des espaces méningés. L'étape initiale de la colonisation est favorisée les pili de type I spécifique de récepteurs à la surface des cellules épithéliales oropharyngées.

La capsule de sérotypes K1, est un facteur de virulence intervenant lors des différentes étapes du processus invasif (Bingen E., 1999).

3. Physiopathologie :

La pathogènes de *E. coli* K1 au coures des méningites néo natales est caractérisée par une interaction complexe entre l'hôte et certaines facteurs microbiennes.

L'envahissement des espaces méningés par *E. coli* suppose différentes étapes préalables :

- Colonisation des muqueuses oropharyngées et intestinales.
- Translocation de la muqueuse intestinale vers le sang.
- Résistance aux défenses de l'organisme et multiplication dans le sang.
- Traversée de la barrière hémato-méningée et multiplication dans le liquide céphalo-rachidien (Bingen E., 1999).



Chapitre II

les anciennes techniques

II-Les anciennes techniques :

L'identification d'une souche bactérienne ne peut se faire que par rapport à des espèces déjà définies et classées.

Dans le laboratoire de la bactériologie, il faut d'abord l'observer à l'examen direct par des observations microscopiques, avec ou sans coloration spécifique qui permettent de déterminer des caractères morphologiques ou structuraux essentiels : forme cellulaire, type de regroupement, présence ou absence de spores par coloration de Zichel Nelson, Gram par coloration de gram, présence ou absence de la capsule par la solution de Nigrosine et la mobilité par bleu de mythelène.

Ensuite l'obtenir en culture pur ou clone, la purification se fait pour isoler les autres germes éventuellement présents dans le prélèvement, et elle se fait par ensemencement d'un échantillon adéquat, et après l'incubation on fait un ensemencement sur gélose en stries et puis l'incubation.

Puis la détermination de certains de ses caractères phénotypiques, morphologiques, biochimiques, antigéniques et culturels (Durand G. et Frezet S., 2002-2003).

II-1-Les tests métaboliques (biochimiques) :

1-Le test de l'oxydase :

Ce test détecte un type particulier de chaîne respiratoire, qui comporte en fin de chaîne un Cytochrome C et l'oxydase associée. Les bactérie qui possèdent une telle chaîne peuvent oxyder des composés chimiques comme le réactif de l'oxydas de Kovak (dihydrochlorure de tétraméthyl-p-phénylenediamin1).

Les électrons sont transférés de ce réactif au cytochrome c et de là, via l'oxydase, à l'oxygène aussi oxydé, le réactif développe une couleur violette intense. Pour effectuer le teste on humecte une petite surface de papier filtre de quelques gouttes de réactif de l'oxydase de kovacs et on y étale une petite quantité de matériel bactérien, au moyen d'une spatule en verre ou d'une boucle de platine.

Les espèces oxydase positives donnent une coloration violette immédiatement ou dans les 10 minute (Singleton P., 1999).

2-Le test d'oxydation fermentation :

Ce test détermine si un organisme recourt à un métabolisme oxydatif (respiratoire) ou à un métabolisme de fermentation pour utiliser un hydrate de carbone donné (souvent le glucose). On remplit deux tubes a essai sur une hauteur de 8 cm environ, avec de la gélose péptonée contenant l'hydrate de carbone en question et un indicateur de pH, le bleu de bromothymol, qui rend le milieu vert.

Un des deux tubes est chauffé a la vapeur pour éliminer l'oxygène dissous et est refroidi rapidement juste avant l'utilisation. Chaque tube est alors inoculé avec l'organisme à tester par piqûre en gélose profonde jusqu'à 5 cm environ. Dans le tube chauffé le milieu est immédiatement recouvert d'une couche de paraffine liquide stérile, d'environ 1 cm d'épaisseur. Les deux tubes sont en suite incubés et examinés après 1 à 14 jours : le jaunissement de l'indicateur de pH indique l'utilisation de l'hydrate de carbone, c'est-à-dire la production d'acide.

L' *E.coli* fait jaunir les deux milieux, dans le milieu recouvert de paraffine, le glucose est fermenté tandis que dans le milieu non paraffiné, il est d'abord attaqué par la respiration, puis par la fermentation (Singleton P., 1999).

3-La formation d'acide ou de gaz à partir d'hydrates de carbone :

La gamme des sucres qu'un organisme donné utilise peut se déterminer simplement en faisant croître cet organisme dans une série de milieux, contenant chacun un sucre différent (comme source de carbone) et un système pour détecter l'utilisation de sucre.

Quand un sucre est métabolisé, il se forme des produits acides et l'indicateur de PH révèle l'acidification (Singleton P., 1999).

4-Les tests IMVIC :

IMVIC: test de l'indole, test au rouge de méthyle, test de Voges-Proskauer et test au Citrate.

- Test de l'indole: ce test met en évidence la production d'indole à partir de Tryptophane. Si le test est positif, l'indole présent dans la culture se dissout dans le réactif qui devient rose ou rouge et forme une couche à la surface.

- Le test au rouge de méthyle (test RM): Ce test détermine si un organisme, croissant dans un milieu Peptone-glucose tamponné au phosphate, et capable de produire suffisamment d'acide (en métabolisant le glucose) pour abaisser le PH du milieu de 7,5 jusqu'à 4,4 ou moins. Quand l'organisme est RM+, la culture devient donc rouge.

- Le test de Voges-Proskauer (test VP): ce test détecte la capacité qu'à un organisme de fabriquer de l'acétoïne. Si l'acétoïne est présente, elle est apparemment oxydée en diacétyl lequel, dans les conditions du test, donne une coloration rouge (test VP+).

- Test du citrate: ce test détermine la capacité qu'un organisme d'utiliser le citrate comme seule source de carbone. Les organismes qui se développent dans le milieu sont dites citrate positive (Singleton P., 1999).

5-Le test de l'uréase:

Les uréase sont des enzymes qui hydrolysent l'urée, en dioxyde de carbone et ammoniac. On peut détecter la production d'uréase par les entérobactéries ont les cultivant sur la gélose à l'urée de Christensen : un milieu tamponné au phosphate contenant du glucose, de la peptone, de l'urée, et le rouge de méthyle comme indicateur de pH. Sur ce milieu, les souches uréase positives libèrent de l'ammoniac qui élève le pH et fait virer l'indicateur au rouge (Singleton P., 1999).

6-Le test de la phénylalanine désaminase (test de APP):

Ce test détermine si un organisme est capable de désaminer la phénylalanine en acide phénylpyruvique (APP).s'il est présent, l'APP donne une coloration verte avec le chlorure ferrique (Singleton P., 1999).

7-Le test à l'ONPG:

L'utilisation du lactose fait souvent intervenir deux enzymes une galactosidase (perméase), et une β -D-galactosidase. Pour détecter la présence de la β -D-galactosidase dans de tels organismes, on recourt à une substance ONPG qui peut pénétrer dans la cellule sans perméase spécifique. Des qu'il est dans la cellule l'ONPG est clivé par la

galactosidase en galactose est en o-nitrophényl de couleur jaune. Dans le test ONPG on cultive l'organisme pendant 18 à 24 heures dans du bouillon contenant de l'ONPG. L'apparition de l'O-nitrophényl (Jaune) dans le milieu indique la présence de B-Dgalactosidase (test positif) (Singleton P., 1999).

8-Le test MUG (4-méthyl umbelliféryl-B-D-glucuronide) pour *E.coli*:

Ce test aide à la détection d'*E.coli* dans les cultures. On ajoute le réactif MUG au milieu de culture avant l'enoculation. La plupart des souches d'*E. coli* contiennent la B-glucuronidase qui, si le MUG est libre, un composé fluorescent par l'apparition d'une fluorescence vert bleu, lorsqu'on expose la culture à des rayons ultraviolets de longueur d'onde 336nm. (Singleton P., 1999).

9-La production de sulfure d'hydrogène:

De nombreuses espèces bactériennes produisent du soufre d'hydrogène, notamment par la réduction du sulfate ou via le métabolisme des acides aminés soufrés. Un test sensible au sulfure sera vraisemblablement positif, même pour les espèces qui n'en produisent que très petites quantités. Une version du test consiste à inoculer l'organisme dans un tube par piqûre en profondeur dans un milieu solide à base de gélatine, contenant de la peptone et une faible concentration de chlorure ferreux. L'organisme qui fabrique beaucoup de sulfure donne naissance à des quantités visibles de sulfure ferreux noir (Singleton P., 1999).

10-Les tests de décarboxylases:

Ces tests détectent la capacité qu'a un organisme de produire des décarboxylases, enzymes qui décarboxylent les acides aminés Argénine, lysine et Ornithine, respectivement agmatine, cadaverine, putrexine. On inocule avec l'organisme à tester trois tubes de bouillons décarboxylase de Moller, contenant chacun du glucose, de la peptone, un des acides aminés et les indicateurs des pH, dans chaque tube, le bouillon est recouvert d'une couche de paraffine stérile, l'incubation est à 37°C pendant 4 jours. Tout d'abord le milieu s'acidifie suite à la métabolisation du glucose. Si aucune décarboxylase n'est synthétisée, le milieu reste jaune. Part contre, la décarboxylation de l'acide aminé donne naissance à un produit alcalin. Le pH s'élève donc et le milieu devient pourpre.

Il faut prévoir un milieu témoin, semblable au milieu du test, mais à part l'acide aminé qui est omis. Ce témoin doit devenir et rester jaune. (Singleton P., 1999).

11-le test de réduction de nitrate:

Ce test détecte si un organisme est capable de réduire le nitrate. On cultive l'organisme pendant un ou plusieurs jours dans du bouillon nitraté par exemple : de l'eau péptonée contenant de 0,1 à 0,2 % de nitrate de potassium. Le milieu est alors examiné pour voir si il y a réduction du nitrate. L'absence de coloration rouge peut signifier soit que le nitrate n'a pas été réduit, soit que le nitrate s'est formé mais il a été en suite réduit, par exemple : en azote et ammoniac pour distinguer entre ces deux possibilités en ajoutant une trace de poudre de zinc qui réduit le nitrate en nitrite. S'il y a du nitrate, l'addition de zinc fera apparaître une coloration rouge puisque le nitrite nouvellement formé se combinera avec les réactifs du milieu (Singleton P., 1999).

12-Les microméthodes:

Les microméthodes sont des protocoles miniaturisés que l'on utilise pour effectuer simultanément toute série de test biochimique d'identification de routine, sur un organisme donné. Ces protocoles impliquent l'usage de kit commerciaux qui économisent temps, espace et matériel (Singleton P., 1999).

13-Système API:

Consiste en une galerie de plastique comportant un certain nombre de microtubes qui contiennent chacun un milieu déshydraté différent. Chaque micro-tube est inoculé avec une suspension de l'organisme à tester. On ajoute de l'huile de paraffine pour éviter tout contact avec l'air dans les tubes ou c'est nécessaire et on met la plaque à incuber. Ultérieurement, on ajoute des réactifs là où ils sont requis, pour détecter des produits métaboliques particuliers. Il existe des systèmes de test API, entérotube II pour les entérobactéries (*E. coli*) (Singleton P., 1999).

II-2-Les techniques immunologiques:

Ils sont principalement utilisés pour la détermination des entérotoxines LT, ST et VT.

-Pour la toxine LT:

Il existe plusieurs méthodes pour la mettre en évidence parmi les quelles le choix sera fait en fonction du matériel et des marqueurs disponibles localement.

1-GM1 ELISA:

Le principe consiste à révéler la fixation de la toxine LT sur le ganglioside GM1 qui en est le récepteur au moyen d'un sérum de cobaye anti-LT. Les anticorps de cobaye fixés sur la toxine sont ensuite eux même révélés par un sérum anti-cobaye marqué avec la phosphatase alcaline ou la peroxydase et le système ELISA classique utilisant un substrat de l'enzyme permet, par méthode de colorimétrie, de révéler les réactions positives (Leminor L., Verron M., 1982).

2-BIKEN TEST:

(Test de précipitation en milieu gélifié suivant le même principe que le test d'ELEK pour mettre en évidence la toxine diphtérique. (Leminor L., Verron M., 1982).

3-IMMUNOHEMOLYSE:

La toxine se fixe spontanément sur les hématies, cette fixation est révélée par un sérum anti-CT et du complément qui provoque. Cette méthode rapide et très peu onéreuse, peut être pratiquée en milieu liquide ou en milieu solide (Leminor L., Verron M., 1982).

4-La recherche du pouvoir cytotoxique, deux lignées cellulaires sont le plus généralement utilisées, des cellules y1 de surrénale de souris (la toxine induit un arrondissement, une ballonnisation des cellules) et des cellules CHO-K1 d'ovaire hamster chinois (la toxine induit un allongement des cellules). Ces modifications morphologiques sont accompagnés d'une stimulation de l'AMP-cyclique. Elles sont inhibées par le sérum antitoxine LT (Leminor L., Verron M., 1982).

-Pour la toxine ST :

La méthode la plus employée est le test sur le souriceau de 04 jours. 0,1ml⁻ de filtrat (additionné d'un colorant pour faciliter le test).est injecté dans l'estomac de 03 souriceaux. Les animaux sont tués quatre heures plus tard par des vapeurs de chloroforme, l'intestin entier est enlevé et le poids de la masse intestinale est comparé avec celui du corps. Un rapport supérieur à 0,1 correspond à un test positif.

Des méthodes immunologiques, utilisant des anticorps anti-ST,(obtenus en couplant cette petite molécule à de l'albumine ou à la fraction B de la toxine LT ou en la polymérisant pour la rendre antigénique) remplaceront certainement dans un proche avenir la méthode sur souriceau. (Leminor L.,Verron M.,1982).

-VEROTOXINES (Shiga-Like toxin VT):

Ces toxines provoquant le détachement du verre des cellules vérocultures en monocouche. La toxine VT est neutralisable par sérum anti-toxine de *S. dysenteriae* I. (Leminor L., Verron M., 1982).

-Sondes d'ADN:

Il existe des sondes permettent d'identifier par hybridation ADN/ADN les gènes qui codent pour divers facteurs de pathogénicité, entre autres, les toxines LT, ST et VT. Cette méthode sera appelée à se développer en particulier, pour détecter les *E.coli* producteurs de ST quand seront disponibles des sondes a montre qu'il existe une hétérogénéité entre les gènes qui codent pour la production de VT chez des souches de sérovars différent. (Leminor L., Verron M., 1982).

II-3-Les techniques de la biologie moléculaire :

Des techniques expérimentales permettent d'induire avec efficacité des transferts génétiques chez les bactéries. Ces techniques ont considérablement gagné en fiabilité et en diversité avec le développement spectaculaire de la biologie moléculaire et du génie génétique.

Le clonage moléculaire ou clonage de gènes a pour objectif l'introduction d'ADN exogène dans la cellule bactérienne, pour y être multiplié. Les gènes transférés peuvent être de diverses origines .après son isolement et sa purification, cet ADN subit une recombinaison in vitro par l'utilisation des différents outils de l'ingénierie génétique : enzyme de restriction, ADN –ligases, transcriptases reverse. Les ADN recombinés, in vitro sont alors associés à des vecteurs plasmidiques, sous la forme de plasmides hybrides transféré à la bactérie hôte par transformation pour y être répliqués.(Bousseboua H.,2002).

3-1-Techniques d'extraction de l'ADN :**-Méthodes physiques:**

Le choc thermique est encore employé, les autres techniques comme les ultrasons, les billes de verre; le broyage en gel d'alumine, four à micro-ondes, presse de French restent anecdotiques. (Durand G. et Frezet S., 2002-2003).

-Méthodes chimiques:

La lyse alcaline permet en deuxième intention de lyser des bactéries résistantes par des protocoles utilisant la soude à basse molarité à des températures élevées. (Durand G. et Frezet S., 2002-2003).

-Méthodes enzymatiques : (Durand G. et Frezet S., 2002-2003)

- Protéinase K
- Lysosome
- Achromopeptidion employé à Lyon-sud
- Proase
- Lysostaphine

-Méthodes utilisant les tensio-actifs:

Les tensioactifs comme le sodiumdodécylsulfate (SDS) à 0,5%, le Tween 20 ou le Nonidet P40 sont utilisés dans les autres agissent en déstabilisant les édifices lipoprotéiques des enveloppes bactériennes et en sensibilisant les micro-organismes aux traitements lytiques (Durand G. et Frezet S., 2002-2003).

-Extraction des ADN du lysat bactérien:

Le mélange de lyse pouvant parfois être utilisé directement pour la PCR, mais le plus souvent la richesse des échantillons cliniques en protéines impose un minimum de purification entreprise par différentes méthodes :

*Extraction des protéines par le TEK-phénol-chloroforme-alcool isoamylique et précipitation par un agent entraînant comme le polyéthylène glycol ou le chlorhydrate de spermine.

*Colonnes de purification de type chromatographique. (Durand G. et Frezet S., 2002-2003).

3-2-Techniques d'isolement des acides nucléiques :**1-La Centrifugation iso- pycnique:**

Permet de séparer des macromolécules de densités différentes, d'échantillon est déposé en surface d'une solution dont la concentration et donc la densité, augmentent du bas vers le haut du tube à centrifuger (gradient de densité). La centrifugation jusqu'à l'équilibre amène chaque molécule de l'échantillon au niveau du gradient qui correspond à sa propre densité. On peut séparer les différentes formes d'ADN sur un gradient de chlorure de sodium. (Singleton P., 2005).

2-La Chromatographie:

On peut séparer les molécules différentes d'un échantillon en passant celui-ci sur/ ou à travers un support stationnaire approprié qui retient ou laisse passer les molécules selon leurs propriétés physiques, on trouve :

-Chromatographie d'affinité qui exploite la spécificité des liaisons entre certains types de molécule.

-la Chromatographie sur colonne centrifugée, elle a recourt à la force centrifuge pour accélérer le passage d'un échantillon liquide à travers une colonne de fines particules fermement tassés. (Singleton P., 2005).

3-L'Électrophorèse:

Peut résoudre un mélange de molécules chargées. Dans l'électrophorèse sur gel, on dépose l'échantillon dans un puits à une extrémité du gel et on applique un voltage entre les deux extrémités. On force ainsi chaque molécule à se déplacer à travers le gel, soit vers l'anode soit vers la cathode, selon sa charge. (Singleton P., 2005).

Les gels polyacrylamide, qui ont des maillages de petite taille sont utilisés pour séparer de petites fragments d'ADN ou les ARN, pour de plus grands morceau d'ADN, on emploie les gels d'agarose dans le gel, les molécules d'acide nucléique se séparent, selon taille, en zones distinctes qui peuvent être colorées in-situ, et transférées pour l'analyse ultérieure sur une membrane par le procédé de transfert de southern ou par électrotransfert. (Singleton P., 2005).

3-3-Techniques d'hybridation :

Le principe des techniques d'hybridation moléculaire repose sur la capacité de séquences monobrin d'ADN (ou d'ARN) complémentaires de se rematurer spontanément en une séquence double brin, dont le niveau d'énergie libre est, donc thermodynamiquement favorisé.

Les techniques d'hybridation sont également utilisées quant il s'agit d'identifier Parmi un mélange de fragments, la présence d'un fragment particulier et d'en étudier sa taille, éventuellement la variation locale de la séquence. (Luis Serre et coll, 2002).

1-Hybridation d'un Southern blot:

Un southern blot est constitué d'une collection de fragment de restriction qui ont été séparés par électrophorèse puis dénaturée et transférés sur une membrane solide où ils sont accessibles aux techniques d'hybridation moléculaire.(Louis Serre J et coll ,2002).

2-Hybridation sur colonies:

Elle commence par la réalisation d'une réplique des colonies sur un filtre de nitrocellulose. On ajoute au filtre une sonde marqué, qui peut se lier à une séquence spécifique dans le gène ou l'ADNc recherchés un lavage élimine les molécules de sondes non liées, le marquage de la sonde permet d'identifier l'ADN voulu, et par conséquent la colonie correspondante sur la boîte d'origine. (Singleton P., 1999).

3-4-Le clonage:

C'est une technique qui permet de produire un ensemble de micro-organismes ou d'eucaryotes parfaitement identiques par leur génome.

Pour le clonage d'un gène bactérien, il faut d'abord isoler le gène voulu des autres gènes du génome,

On peut commencer par construire une banque génomique de l'espèce et passer ensuite cette banque (ou cible) pour trouver le gène considéré.

Et pour isoler les molécules recombinantes qui portent ce gène: on va utiliser la transformation pour introduire la banque entière de molécules recombinantes dans une population de bactéries mutées, défectives pour le gène.(Scriban R.,1999).

Chapitre III

*les avancées apportées par
les nouvelles techniques*

III- les avancées apportées par les nouvelles techniques :**III-1-Les Nouvelles techniques :**

De nombreuses approches ont été développées dans la but d'isoler et de détecter les souches de *E.coli* pathogènes .ces méthodes peuvent être divisé en trois catégories.

Utilisation de caractéristique biochimique spécifique des souches de *E.coli* pathogènes (Bouvet J., Vernozy-Rozand C., 2000).

Méthode immunologique basé sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les verotoxine ou l'antigène somatique (O₁₅₇ : exemple)

Méthode génétique détectant les gènes codant les facteurs de pathogénéicité ou de marqueurs associés au sérotype pathogène (Bouvet J., Vernozy-Rozand C., 2000).

Cette synthèse va consister a décrire les méthodes génétiques mise au point pour détecter les gènes de pathogénéicité de certain *Esherichia*, comme exemple O₁₅₇ :H7, O₁₁₁. Ces gènes seront effectués par amplification PCR

Enfin les méthodes d'électrophorèse en champ pulsé et la ribotypie seront utilisées à des fins d'étude épidémiologique (Tap J., 2004).

III-1-1-PCR (polymérase Chain réaction) c'est-à-dire réaction de polymérisation en chaîne :

Cette technique décrite en 1985 par K. MULLIS et al permet d'amplifier, c'est-à-dire d'augmenter de manière considérable la quantité de DNA dont on dispose initialement. (K. MULLIS a reçu le prix Nobel de chimie 1993.)

Cette technique impose de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment de DNA à amplifier. Connaissant chacune de ces deux séquence (sur une vingtaine de nucléotides) on synthétisera des oligonucléotides complémentaires, ces oligonucleotides auront 2 fonctions :

1- Ils permettront de repérer la partie de DNA à amplifier.

2- Ils serviront d'amorce à la DNA polymérase, Des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprenant :

- Dénaturation par la chaleur à 92-95°C (pour séparer les deux brins de DNA).
- Hybridation avec les deux amorces spécifiques (on anglais annealing), leur fixation est rendue possible grâce à un abaissement de la température à 50-55°C .Un des deux oligonucléotides se fixe sur 1 brin de DNA, le 2 sur l'autre brin.
- Extension des amorces avec une DNA polymérase à 70-72°C cette technique connaît un grand essor depuis qu'il a été possible en 1988 d'utiliser une DNA polymérase non inactivé par la chaleur. Il s'agit de la taq polymérase (isolé d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude « *Thermus aquaticus* ». On peut ainsi effectué un nouveau cycle sans avoir à ajouter chaque fois de l'enzyme, Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des bains-marie programmables en température et en temps.

A la fin de chaque cycle, le nombre de brin de DNA a été multiplié par 2, l'amplification est donc exponentielle. En pratique le rendement n'étant pas de 100%, 30 à 40cycles permettent d'amplifier la séquence de DNA souhaitée par un facteur 100000à1000000 (Etienne J., 1999).

Il existe de nombreuses variantes de la PCR dont :

-Etude de l'ARN par PCR :

Pour étudier l'ARN, une transcription inverse ou inverse transcription est effectuée au préalable (RT-PCR).

-PCR multiplex :

La PCR multiplex est l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles (deux au moins) dans un même tube d'amplification. Chaque amplification (dans le même tube) doit être indépendante des autres, le résultat devant être identique à celui obtenu isolément dans un tube avec un seul couple d'amorce.

Chaque produit d'amplification doit avoir une taille peu différente de celle des autres pour obtenir à peu près la même efficacité de PCR. Mais la différence doit être suffisante pour qu'on puisse les distinguer (par exp. sur un gel d'agarose) Durand G., Frezet S., 2002-2003).

-PCR niché ou nested PCR :

Pour obtenir une plus grande sensibilité en PCR, il est possible d'effectuer 2PCR successives, sur une électrophorèse des fragments obtenus après une première PCR. On observe généralement une bande principale. Mais également toute une série de petites bandes. Ceci provient du fait que les amorces peuvent s'apparier à diverses régions du DNA par hybridation non spécifique.

Une 2ème PCR pratiquée avec les mêmes amorces, amplifierait également ces artefacts. La nested PCR permet une meilleure spécificité : dans cette technique 2 couples d'amorces différents sont successivement utilisés (Etienne J., 1999).

-AP-PCR (PCR avec amorce arbitraire) :

Des copies d'une amorce arbitrairement choisie se fixent en divers endroits à chacun des brins d'ADN chromosomique (dénaturé par la chaleur). Dans des conditions de stringence faible, ces fixations se font aux séquences qui correspondent le mieux, bien qu'avec des mésappariements. Dans certains cas deux amorces se fixeront relativement efficacement, sur les brins opposés en des endroits séparés de quelques centaines de bases. S'il peut y avoir allongement de brin, à partir de ces amorces, si on limite cet allongement de temps, les produits PCR qui en résulteront seront deux courts fragments d'ADN simple brin. (Singleton P., 1999).

III-1-2-Les trousse commercialisées :

Bien que des PCR maison subsistent dans de nombreux laboratoires, l'apparition de nombreux kits et automates va modifier les méthodes de diagnostic en améliorant la standardisation et la reproductibilité des résultats. Il faut distinguer les trousse spécifiques permettant l'identification d'un agent pathogène grâce à des sondes spécifiques pour la détection des amplicons. Trousse génétique qui permettant la détection de tout produit obtenu par amplification génique quelque soit la cible recherchée

(Durand G., Frezet S., 2002-2003).

III-1-3-Les puces à ADN, Puces à gène, Biopuce :

La technologie des sondes associée à celle de la PCR a permis l'émergence d'une nouvelle méthode qui semble promise à un bel avenir. Les puces à ADN (ADN chips). La fabrication des puces à ADN est une évolution technologique fantastique combinant différentes technologies : l'informatique et la micro optique.

Elles constituent une miniaturisation de la technique du reverse dot. Blot visant à analyser des acides naturels ou amplifiés la puce à DNA est constituées d'un réseau dense et régulier de micro surface appelées unité d'hybridation inerte comme le poly propylène le nylon, le verre au le silicium), d'une dimension de 1cm² à 3cm² chacun de ces unité d'hybridation UH gravées sur un support plan (substance chimiquement inerte comme le polypropylène le nylon, le verre ou le silicium), d'une dimension de 1cm à 3cm², chacune de ces unités d'hybridation a une localisation déterminé et sur chacune d'elle est greffée des dizaines de milliers de sondes oligonucléotidiques dont les séquences sont quelconques ou correspondent au gène recherché.

Les puces à basse densité pourraient être appliquées en bactériologie pour la détection et l'identification simultanée d'un grand nombre d'espèce bactérienne. La recherche de gène de résistance aux antibiotiques ainsi que la recherche de gène de virulence.

L'analyse des données par un ordinateur permettrait d'optimiser les conduites diagnostiques et thérapeutiques à tenir pour le malade l'analyse simultanée du terrain génétique du patient en particulier des éléments pouvant favoriser l'infection par certaine bactéries, peut également être envisagée. L'étude de prélèvement environnemental permettrait aussi d'améliorer la prévention des infections nosocomiales (Durand G., Frezet S., 2003).

III-1-4-Ribotypie :

Principe :

Le riboprinter® est un automate permettant de ribotyper 8 souches à la fois en 7 heures environ. Il réalise, analyse et compare des profils de restriction des gènes codant les ARN ribosomiques de souches à identifier.

L'automatisation de la technique commence avec l'extraction de l'ADN qui est réalisée grâce aux traitements des souches avec des agents de lyse.

L'ADN est ensuite coupé par une enzyme de restriction (*MLuI* : exp.)

Les fragments obtenus sont alors séparés par électrophorèses en gel d'agarose miniaturisé. Les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire sont placés dans les puits du gel. Les fragments séparés selon leur taille, sont transférés simultanément sur une membrane de nylon se déplaçant perpendiculairement contre l'extrémité du gel, capturant et immobilisant ainsi les différents fragments d'ADN en fonction de leur taille, cette membrane est imprégnée d'une solution dénaturante pour l'ADN.

Après séchage et lavage de la membrane les fragments dénaturés sont ensuite hybridés à 66°C avec une sonde d'ADN complémentaire à une partie de l'opéron d'ARNr *rrrB* d'*E.coli* qui est constitué des séquences codant pour l'ARNr, 16s, ARNr23. Après 2 heures d'hybridation, la membrane est lavée, séchée et traitée avec un réactif bloquant les suites non spécifique.

Le conjugué, un anticorps monoclonal lié à la phosphatase alcaline est ensuite ajouté. Après lavage de la membrane pour ôter le conjugué non lié, le substrat chimioluminescent est rajouté. Une émission de lumière est détecté par une camera

CCD, la camera converti alors l'intensité de la lumière issue des fragments luminescents d'ADN en information digitale. Les images brutes sont alors transmises à l'ordinateurs PC Ribaprinter®.

Ces images peuvent être transférées sur un ordinateur Macintosh et analysées par l'ensemble des logiciels taxotrons (Tap J., 2004).

III-1-5-Électrophorèse en champs pulsés :

Le principe de l'électrophorèse en champs pulsé (ECP) est similaire à celui du ribotyping : L'ADN est soumis à l'action d'une endonucléase de restriction pour donner une série de fragments dont la taille et le nombre sont caractéristiques de l'isolat étudié, la différence entre les deux méthodes réside au niveau du choix de l'endonucléase, l'ECP est basée sur l'utilisation d'endonucléases de restriction reconnaissant des sites de coupure « rares ». (*XbaI.exp*) générant un nombre restreint de fragments d'ADN donc de très grande taille.

La difficulté de cette technique, basé sur l'analyse de chromosome bactérien intact, réside précisément au niveau de la manipulation de ces molécules de grande taille qu'il faut éviter d'endommager lors de la préparation de l'échantillon. Puis lors de la séparation des fragments d'ADN.

La préparation de l'ADN se fait par lyse « in situ » des cellules d'une colonie bactérienne dans une matrice semi solide d'agarose. Pour éviter les forces de cisaillement susceptibles d'endommager l'ADN. Après digestion par une endonucléase de l'ADN empaqueté. Les fragments résultant sont séparés selon une technique particulière d'électrophorèse basé sur l'application d'un champ électrique alterné multidirectionnel : un champ pulsé (fig.). Les fragments séparés sont alors révélés par simple coloration au « Syber green » pour donner le pulsotype (empreinte génétique) caractéristique de chaque isolat analysé.
(Tap J., 2004).

III-1-6- PCR-ribotyping

La technique utilise un jeu d'amorces spécifique des gènes codant pour les ARN 16_{sARNr} et $23_s ARNr$, elle permet d'analyser les variations de longueurs des spacer ou ITS séparant les gènes codant pour l'ARN ribosomal. Il s'agit d'une méthode rapide et puissante qui convient bien à la détection d'une infection nosocomiale car pouvant être employée en routine et en temps réel (Durand G., Frezet S., 2002-2003).

Grâce à la serotype à l'aide de sérum, au serotypage moléculaire on peut déterminer le serotype.

Puis par la recherche de gène de pathogénicité puis permet de définir le pathovar de *E. coli* comme les gènes :

Stx : codant de toxine STF (STX1 et STX2 pour les EHEC)

AffI : codant une adhesine spécifique de EAEC

CNF1 : codant la toxine CNF1...

bfp/A : codant la «bundle forming pili»...

Les techniques de ribotypie et de pulsotypie qui sont des marqueurs épidémiologiques permettent une identification moléculaire plus précise, contribuant à des analyses épidémiologiques.

Dans la 1^{er} étape il s'agira de vérifier par sero-agglutination et par serotypage moléculaire que les souches étudiées sont du serogroup pathogène, exemple : ici O₁₁₁. Après le typage par une méthode moléculaire des antigènes O et H (Tap J., 2004).

III-2- l'utilisation des nouvelles techniques pour la détection des gènes pathogénicité :

III-2-1-Extraction de l'ADN par des Kits :

Exemple O₁₁₁ :

Pour extraire l'ADN bactérien, deux kits seront utilisés en fonction de la méthode utilisée (Tap J., 2004).

A- Le kit promega® :

Est utilisée pour extraire l'ADN à partir d'une souche bactérienne mise en culture dans un bouillon Trypto caséine soja pendant 18 heures à 37°C. L'extraction par le kit promega® permet d'extraire de l'ADN purifié permettant par la suite une amplification de séquence supérieure à 10 KPb. (Tap J., 2004).

B- Le Kit insta gène Matrix (Biorad®) :

Permet en un minimum de temps d'extraire grossièrement l'ADN utile pour une recherche de gène de pathogénicité, cette extraction rapide d'ADN en petite quantité est suffisante pour une PCR avec des amplifications du 1Kb (Tap J., 2004).

III-2-2-Serotypage moléculaire :

III-2-2-a-Typage moléculaire de l'antigène somatique O :

Principe :

Après une PCR sur le cluster de gène *rfb* avec des amorces complémentaires au « JUMPstart » et au gène « Gnd », la restriction par MboII du produit amplifié permet d'obtenir un profil sur gel d'électrophorèse, ce profil sera ensuite comparé à un banque de données de profils type afin de typer l'antigène O.

- A partir d'ADN extrait par le kit promega®, le cluster *rfb* d'environ 15 à 20 kb est amplifié par PCR avec les amorces complémentaires au « JUMPstart » et au « Gnd », le réactif utilisé pour la PCR sont fournis avec le kit « Expand long Template PCR system » de Boehringer.

- Après vérification de la réussite de l'amplification du cluster *rfb* sur gel d'électrophorèse, les produits amplifiés sont restreints par MboII (Amersham, Pharmacia, Biotech).

La coloration du gel s'effectue au bromure d'éthidium (BET) le gel est révélé sous les UV puis numérisé par photographie. Enfin traitement des données par informatique Taxotron® (Tap J., 2004).

Programme PCR « OPO »	
1-Dénaturation 94°C : 2min	
2- Dénaturation 94°C : 10sec	
3- hybridation 63°C : 30sec	10 cycles
4-élongation 68°C 15 min	
5- Dénaturation 94°C : 10 sec	20 cycles+20sec en plus d'élongation par cycle
Hybridation 6-63° : 30 sec	20 cycles +20sec en plus d'élongation par cycle
7-élongation 68°C : 15min	20 cycles+20sec en plus d'élongation par cycle
8-élongation 72°C : 7min	

La photographie numérique est scannée par le logiciel restricto Scan®. Les coordonnées en pixel sont ainsi obtenues pour tous les profils de restriction. En prenant ensuite comme référence le marqueur de poids moléculaire (amplisize+lambdaHindIII), Le logiciel restrictotyper® permet a partir des coordonnées en pixel d'obtenir les poids moléculaire, de tout le fragment sur chaque profil de restriction étant sous forme de poids moléculaire (Pb). Les données expérimentales de chaque profil peuvent être comparé avec une tolérance de 5% à la base de données R. A chaque profil « type » R (ex : R111a) correspond l'antigène O (ex : O111) (Tap J., 2004).

III-2-2-b-Typage moléculaire de l'antigène flagellaire H :

Principe :

Après une PCR sur le gène *flic*, la restriction par XbaI du produit amplifié permet d'obtenir un profil sur gel d'électrophorèse ce profil est ensuite comparé à une banque de donné de profil type afin de typer l'antigène H.

- A partir d'ADN extrait par le kit promega, le gène *flic* d'environ 1 Kb est amplifié par PCR. Les amorces utilisées sont les suivant :

Amorce 3' : FSA 1Sc : 5'-CAA GTC ATT AAT ACM AAC AGC-3'

Amorce 5' : rFSA 1Sc: 5'-GAC ATR GAV ACT TCS GT-3'

Avec: M= A ouC, R= A ouG, V=A ouG et S= G ou C

Un volume reactionnet de 50ul est préparé pour amplifie 1ul d'ADN.

Mélange réactionnel pour amplifier 1uL d'ADN (1 réaction PCRFSa)

Après vérification de la réussite de l'amplification du gène *flic* sur gel d'électrophorèse, les produits amplifiés subissent une restriction par *HhaI* (Amershan pharmacia Biotech). Dans un volume final de 25ul un mélange réactionnel est effectué,

- Produit PCR « FSA » :19Sul
- Tampon 10X : 2,5ul
- Enzyme *HboI* 10Ui/μ/ : 3ul

Puis la restriction, la migration, l'amplisize est utilisé comme marqueur de poids moléculaire, la coloration du gel s'effectue au BET, le gel est révélé sous les U.V puis numérisé par photographie. Enfin, traitement des données par informatique (Taxotron®) : les données expérimentales sont comparées à une base de données F avec une tolérance de 5%. A chaque profil « type » F (ex: F₂) correspond l'antigène H (ex: H₂) (Tap J., 2004).

III-2-3-Détection des gènes de pathogénicité *Stx* codant pour une shiga-toxine chez *E.coli* avec le system PCR de Lin et bastien :

Le system mis au point par Lin permet la détection du gène codant pour les shiga-toxine et variantes, après l'amplification du gène *Stx* par PCR et vérification du produit amplifié du gène sera clivé par une enzyme de restriction HincII. Après clivage du produit PCR, plusieurs profils de restriction sont obtenus. Chacun correspondant au type de *stx* : *stx1*, *stx2*, et ses variants les amorces utilisées sont les suivant :

LIN 5' : 5'-GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3'

LIN 3' : 5'-TTT GAT TGT TAC AGT CAT-3'

L'amplification a lieu à 900 Pb et la migration s'effectuée sur un gel d'agarose à 1.6%. Les témoins utilisées sont : témoin positif : EDL (*E.coli* O₁₅₇ : H₇ possédant les gènes *stx1* et *stx2*). Témoin négatif Hb101 (sans gène *stx*), après restriction par HincII dans un bain marie à 37°C pendant 3 heures, les profils obtenus permettent de déterminer le type de variant au gène *stx* (soit *stx1*, *stx2* ou *stx2* variant) (Tap J., 2004).

III-2-4-Détection des gènes de la B- glucuronidase (B-glu), D'attachement (*eae A*) et d'adhérence aggregative (*aaf/1*) par un système PCR multiplex EAA-B :

Le système PCR multiplex EAA-B permet la détection en une PCR unique de trois gènes de *E.coli* :

-Le gène B-glu codant la B-glucuronidase permettant de confirmer la présence d'un *Escherichia coli*.

- Le gène *eaeA* codant une protéine de la membrane externe l'intimine (capable de causer des lésions d'attachement et d'effacement au niveau des enterocytes de la muqueuse intestinal)

- Le gène *aaf/1* codant une adhésine (Fimbriae) spécifique des *E.coli* enteroaggregatifs.

Les amorces suivantes sont utilisées :

B-glu (*uidA*) :

Amorce 3' : UAL : 5'-AAA AGG GCA AGA AAA AGC AG-3'

Amorce 5' : UAR : 5'-ACG CGT GGT TAC AGT CTT GCG-3'

eaeA :

Amorce 3' : FMI : 5'-CAT TAT GGA ACG GCA GAG GT-3'

Amorce 5' : Rgul:5'-ATC TTC TGC GTA CTG CGT TCA-3'

Aaf/1

Amorce 3' : AAFIa : 5'-GCG TTA GAA AGA CCT CCA ATA-3'

Amorce 5' : AAFIb : 5'-GCC GGA TCC TTA AAA ATT AAT TCC GGC-3'

Tableau : Programme utilise pour la détection des gènes de la B- glucuronidase (B-glu), D'attachement (eae A) et d'adeherence aggregative (aaf/1) par un système PCR multiplex EAA-B (Tap J., 2004).

Programme PCR « EAA-B »	
1-Dénaturation 94°C : 3min	
2-Dénaturation 94°C : 1min et 30 sec	30 cycles des étapes
3-Hybridation 43°C : 1min et 30 sec	30 cycles des étapes
4-élongation 72°C : 2min	30 cycles des étapes
5-élongation 72°C : 7min	

Trois témoins sont utilisés pour valider le résultat

-témoins positif : 2348/69(*E.coli* : o₂₆) : eaeA+, B-glu+, et 17/2 (*E.coli*) : aaf+, B-glu+

-témoin négatif : 02-755 (*Hafima alvei*) : glu-, eaeA-, aaf-

L'amplification a lieu pour :

B-glu à 147pb

Eae A à 790pb

aaf à 432pb

III-2-5-Détection des gènes de pathogenicité *bfp* codant le « bundle forming pili » chez *Eshirishia Coli* par le système PCR :(Tap J., 2004).

Le système de détection par PCR du gène *bfp/A* a été testé pour la première fois lors de cette étude, la détection du *bfp* est uniquement faite pour les souches ayant le gène eae. Sa présence permettra de mettre en évidence les vrais EPEC : ceux qui sont capables

De synthétiser à la fois l'intime et le « bundle forming pili » les amorces utilisées sont les suivants :

Amorce 3' : EP1: 5'-AAT GGT TGC GCT TGC TGC-3'

Amorce 5' : EP2:5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA-3'

Tableau : Programme utilise pour la détection des gènes de pathogenicité *bfp* codant le « bundle forming pili » chez *Eshirishia Coli* par le système PCR :(Tap J., 2004).

Programme PCR « BFP »	
1-Dénaturation 94°C : 30sec	30 cycles
2- Hybridation 56°C : 1min	30 cycles
3- élongation 72°C : 2min	30 cycles
4- l'amplification a lieu à 326pb	

III-2-6-Détection des gènes des adhesines fimbrials P .A et S (pap, sfa, et afa) :

Les grènes pap, sfa, et afa ont été détecté par PCR multiplex avec les séquences oligonucléotidiques présentées dans le tableau (Denden I. et al. , 2004).

Tableau:Détection des gènes des adhesines fimbrials P .A et S (pap, sfa, et afa) (Denden I. et al. , 2004).

amorces	Séquence des oligonucleotides (5'-3')	Taille de l'amplicons (Pb)
CNF1	5' AGTGAT AATATA TCAC TATTA TTC	
CNF1	3' GAATTCGTCTCG TTG CTT CA CTG	450
PAP1	GACGGCTG CA CT GC AG GG TG TG GC	
PAP2	AT AT TCCT TT CT GCAG GGAT GCAA TA	328
SFA1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	
SFA2	CGGAGGAGTAATTACAAACCT GGCA	410
AFA1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTG	
AFA2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750

Chapitre IV

*les solutions apportées par
les nouvelles techniques*

IV-Les solutions apportées par les nouvelles techniques :

Les nouvelles travaux ont permis de faire plusieurs découvertes, et donc des nouvelles avancées de l'étude de la toxicité des certaines souches de *E.coli*, nous permettons d'aboutir à certains résultats.

IV-1- Connaître et déterminer des différents gènes et leurs fonctionnements :

A partir d'un échantillon (produit pathologique ou culture bactérienne), le diagnostic génomique nécessite trois étapes dont la première est facultative : extraction, hybridation et révélation du matériel génétique hybridé ou amplifié. Ce qui nous a permis de connaître la

Fonction des gènes responsables de la pathogénicité dans le tableau ci-dessus (Durand G. Frezet S., 2002-2003).

Tableau : Pathovars de *E. coli* responsable des infections

Pathovars	Serogroupes	Action Sur entérocytes	Gènes virulences
EPEC	O26, O55, O86, O111, O111, O19, O125, O126, O127, O128	Adhésion localisée	<i>bfp, eae</i>
EHEC	O157	Pas d'invasion Lésion A /E	<i>stx, eae</i>
ETEC	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O148, O159	Adhésion	<i>lt, st</i>
EIEC	O28, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152, O164	Invasion	<i>inv, ipah</i>
UPEC	O1, O2, O4, O6, O7, O18, O75	adhésion	<i>cnf1</i>

Le tableau présente une synthèse sur les Pathovars et les serogroupes associés à leur action sur les entérocytes et aux gènes caractéristiques responsables de la pathogénicité (Tap J., 2004 ; Denden I. et al., 2004).

IV-2-Mutation :**2-1-Définition :**

Une mutation est définie comme une modification stable et autonome de l'ADN. Elle peut affecter n'importe quel gène chromosomique ou plasmidique qui subit donc un changement dans sa séquence de base. Elle est héréditairement transmise et résulte d'un changement dans la séquence originale des bases de l'ADN, sans implication de matériel génétique étranger. La modification peut concerner une seule base : mutation ponctuelle ou plusieurs bases : mutation multi sites (Bousseboua H., 2002).

2-2-Différents type de mutation

Une mutation peut survenir naturellement chez une bactérie, c'est une mutation spontanée. Elle peut également être provoquée par l'action de facteur physique ou chimique exogènes, c'est alors une mutation induite. Dans les deux cas, les modifications engendrées dans le génotype peuvent résulter de mécanismes divers. (Bousseboua H., 2002).

a-Mutation spontanée :

Une mutation spontanée, appelée aussi mutation naturelle, est un phénomène rare qui survient au hasard, sans intervention de facteurs étrangers. Sa fréquence est en moyenne de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-12} .

Au niveau moléculaire, les mutations spontanées sont essentiellement considérées comme des erreurs accidentelles de réplication de l'ADN. Elles résultent d'une transposition tautomérique (réarrangement) des électrons, pouvant concerner chacune des quatre bases de l'ADN. Par exemple, la thymine est présente dans l'ADN sous sa forme cétonique qui lui permet des liaisons hydrogènes avec l'adénine. Sa tautomerisation lui donne une forme énolique qui l'engage plutôt dans des liaisons hydrogènes avec la guanine. si dans le brin d'ADN répliqué la thymine est sous forme énolique, le nouveau brin d'ADN portera alors une guanine à la place d'une adénine et, dans toutes les replication ultérieures, une paire G-C se formera à la place de la paire A-T présente à l'origine. Mais d'autres mécanismes sont également responsables de mutations spontanées. (Bousseboua H., 2002).

b-Mutation induite :

La fréquence de mutation d'une population bactérienne peut être significativement augmentée (jusqu'au 10^{-2} à 10^{-4}) par un traitement avec des agents mutagènes qui peuvent être de nature physique, chimique ou biologique.

On parle alors de mutation induite qui entraîne dans tous les cas une modification du matériel génétique dont l'effet se manifeste par différents mécanismes. (Bousseboua H., 2002).

2-3-Mécanisme de mutation :

Les mutations résultent, au niveau des gènes, de divers mécanismes plus ou moins répandus et de fréquences très variable :

- **La délétion** est une la perte d'un segment d'ADN, elle se traduit par un nouveau séquençage des bases et donc un décalage de la lecture ;
- **La duplication** est la formation d'une copie d'un segment d'ADN qui est inséré dans le chromosome et modifie la disposition des gènes, tout en augmentant leur nombre ;
- **L'inversion** est le renversement de l'ordre de succession des gènes ;
- **La translocation (ou insertion)** est la migration d'un segment d'ADN d'une région à une autre du chromosome. (Bousseboua H., 2002).

2-4-Les agents mutagènes :

Les mutations sont provoquées par des agents physiques, chimiques ou biologiques qui sont qualifiés de mutagènes.

- **Les rayons ultraviolets** à la longueur de 260 nm, provoquent la formation de dimères entre deux bases pyrimidiques adjacentes (situées dans le même brin d'ADN). de telles mutations sont généralement létales.
- **Les radiations ionisantes** (rayon X, alpha, bêta, gamma) sont responsables de cassures, d'ouvertures des cycles des bases et d'oxydation. Ces mutations sont fréquemment létales.
- **Les analogues des bases** comme les 5-bromo-uracile (analogue de la thymine) provoquent des mutations par substitution.
- **L'acide nitreux** provoque une désamination de la cytosine et de l'adénine. L'hydroxylamine modifie la cytosine et la paire GC est remplacée par la paire AT.
- **Les agents alkylants** monofonctionnels (par exemple l'éthylméthanesulfonate) méthylent la guanine qui va alors s'associer à la thymine.
- **Les agents intercalants** sont des composés aromatiques polycycliques (par exemple le bromure d'éthidium) qui s'insèrent entre les paires de bases et provoquent des erreurs de copie.
- **Les séquences d'insertion**, les transposons, les phages tempérés et les «épisomes s'insèrent dans le génome et inactivent les gènes. Tous les agents mutagènes ne sont pas décrits de nombreuses mutations surviennent en l'absence d'agents mutagènes identifiés(C).

2-5-Un Exemple sur l'effet des mutations :

les gènes de virulences ne sont pas repartis au hasard sur le chromosome bactérien, ils sont regroupés en bloc de virulences dénommées (îlots de pathogénicité) PAI. La perte ou l'acquisition d'un PAI par transfert horizontal transfère une bactérie pathogène en une bactérie non pathogène et inversement (Mariani-Kurkdjan P., 2004).

Des mutants isogéniques de gènes candidats (*eae*, *fliC*, *stx1*, *stx2*) ont été construits par des échanges d'allèle. Les gènes candidats sont clonés dans le plasmide *ptrc99* sans contrôle de promoteur *trc* pour compléter les mutants.

L'expression des gènes chimiokines pro-inflammatoires (IL-8, CCL-20) est insérée par RT-PCR en temps réel suite à l'infection par les *STEC*.

Des mutants de la souche EDL933 (O157:H7) affectés dans le SSTT porté par LEE activent beaucoup moins la réponse inflammatoire que la souche sauvage, alors qu'un mutant délété du gène *eae* (porté aussi par le LEE) codant l'intimine, impliqué dans l'adhésion des bactéries.

Le rôle du flagelle H21 dans l'activation de la réponse est confirmé par la diminution importante observée avec un mutant d'une souche O91:H21 du gène *fliC* codant pour la flagelline. Le mutant *fliC* de la souche de référence O157:H7 n'active plus l'expression des ARNm IL-8, mais active toujours celle des ARNm CCL-20. Enfin les mutants délétés des gènes codants pour les toxines *stx1* et/ou *stx2* activent de façon accrue la réponse inflammatoire (Martin C., 2004).

IV-3-Réparation des dommages à l'ADN (réparation des misappariement) :

On dit qu'il y a un misappariement lorsqu'au sein d'une double hélice d'ADN on trouve une paire de bases différente de GC ou AT.

Le système de réparation des misappariements a été bien étudié chez *E. coli*. Il repose sur le fait que l'ADN est méthylé après la réplication et que donc le brin parental "ancien" et correct est davantage méthylé que le brin nouvellement synthétisé (D).

- Un misappariement peut –il se produire lorsque il y a :

- Erreur de réplication ; dans ce cas la base correcte se trouve sur le brin parental et l'erreur sur le brin nouvellement synthétisé.
- Formation d'un hétéro duplexe entre 2 molécules homologues au cours d'une recombinaison ; s'il existe une petite différence cela formera un misappariement. Dans ce cas le sens de la correction influence la nature des produits de la recombinaison.
- Désamination de la 5 méthyl-cytosine qui donne de la thymine qui se trouve donc appariée avec un G : il faut alors réparer mais T étant une base normale elle n'est pas reconnue par l'ADN glycosylase.

En fin il peut se produire des appariements avec une base modifiée (D).

- Il y a trois modèles de réparation :

L'idée de l'amplification de la méthylation de l'ADN dans le processus de réparation revient à Miro Radman (1975), hôte, avec son équipe, de l'Institut Jacques Monod à Jussieu jusqu'en 2000. Chez en effet, grâce à des méthylases spécifiques, l'ADN est méthylé en position N6 de l'adénine, au sein des motifs GATC. Ceci a lieu avec un certain délai après la synthèse du nouveau brin. Pendant un court laps de temps le brin nouvellement synthétisé est donc sous méthylé par rapport au brin matrice, ce qui permet à des enzymes de le reconnaître et de corriger le misappariement sur ce brin là (D).

Ce modèle est corroboré par l'observation qu'une souche *dam-*, déficiente dans la méthylation de l'ADN, montre un phénotype "spontanément mutateur". On trouve par exemple une fréquence de réversion d'une mutation ponctuelle donnée 10 à 40 fois plus grande chez la souche *dam-* que chez la souche sauvage *dam+* (D).

On démontre le modèle en faisant comme précédemment des ADN de λ hétéro duplexes en partant d'ADNs phagiques portant deux mutations soit P soit C qui se traduisent par un phénotype de plages différent. De plus, un brin de l'hétéro duplexe a été synthétisé dans une souche de *E. coli* *dam+* tandis que l'autre est issu d'une souche *dam-*, donc naturellement sous-méthylé. On compare les fréquences de réparation en mesurant le nombre de plages de chaque phénotype formées par les phages issus de la réplication des hétéro duplexes (D).

V- Discussion

Détection d'*E.coli*O157 :H7 : (Bouvet J., Vernozy-Rozand C., 2000).

La plupart des caractéristiques biochimiques de *E. coli* O157 :H7 sont celles de l'ensemble des *E. coli*. Cependant, alors que 93% des souches de *E. coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures (sor+), *E. coli* O157 :h7 ne fermentent pas le sorbitol (sor-). Il faut tout de même noter que des études ont montré qu'il existe des souches de VTEC O157 sor+. La prévalence de ces souches est inconnue à l'heure actuelle mais les microbiologistes doivent rester très vigilants et ne pas oublier que le caractère sor- des O157 :H7 n'est pas complètement univoque. De plus, 93% des *E. coli* synthétisent une β -glucuronidase mais la majorité des VTEC O157 ne produit pas cette enzyme.

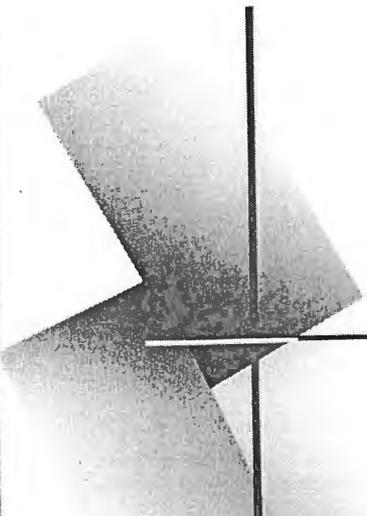
Les anticorps dirigés contre l'antigène O157 sont utilisés dans de nombreuses techniques immunologiques de détection de *E. coli* O157 :H7. Ces tests n'apportent pourtant aucune information sur le type de toxines produites par les souches et ne sont pas spécifiques puisque toute O157 n'est pas forcément VTEC. En outre, il existe souvent des réactions croisées avec d'autres bactéries. De même, les tests basés sur la mise en évidence des verotoxines (immunologiques) ou la détection des gènes *stx* (tests génétiques) ne permettent pas de différencier le sérotype O157 :H7 des autres VTEC.

Contrairement aux méthodes de différenciation basées sur les caractéristiques biochimiques (fermentation du sorbitol et activité de la β -glucuronidase), les méthodes génétiques ne s'appuient pas sur les activités enzymatiques et ne sont donc pas affectées par le type de milieu utilisé, l'émergence de mutants biochimiques ou la présence de bactéries non ciblées ayant des phénotypes très proches.

Les gènes *uidA* (gène codant la β -glucuronidase), *eae* (gène codant l'intimine, responsable de l'attachement de la bactérie aux anthérocytes) et *fliC* (gène codant la flagelline, protéine constitutive du flagelle) peuvent être détectés seuls ou en combinaison avec les gènes *stx* (PCR multiplex).

Exemple : détection du gène *uidA* .(Bouvet J., Vernozy-Rozand C., 2000).

Le gène *uidA* des *E. coli* code une β -glucuronidase. Bien que les souches du sérotype O157 :H7 ne montrent pas d'activité β -glucuronidasique, elles possèdent tout de même le gène *uidA*. La séquence de ce gène présente chez *E. coli* O157 :H7 plusieurs mutations dont une en position 92, le remplacement d'une thymine par une guanine. Cette particularité est retrouvée chez toutes les *E. coli* O157 :H7 et représente donc un marqueur très efficace de ces souches. FENG a utilisé une sonde oligonucléotidique PF-27 permettant de détecter la région de *uidA* spécifique de O157 :H7. Par hybridation sur 239 colonies, il a pu montrer que la sonde PF-27 ne réagissait qu'avec les 17 isolats appartenant au sérotype O157 :H7. Aucune hybridation ne s'est produite avec les 73 *E. coli* n'appartenant pas au sérotype O157 :H7, les 13 *Shigella* et les 8 *Salmonella* exprimant la β -glucuronidase. L'absence d'hybridation avec *E. coli* indiquait que la sonde PF-27 était suffisamment discriminante pour détecter une variation d'une unique base dans la région 5' du gène *uidA* de *E. coli*. La sonde PF-27 apparaissait donc comme spécifique du seul sérotype O157 :H7.



Conclusion

Conclusion :

L'utilisation des nouvelles techniques de la biologie moléculaire, génétique, et microbiologie en bactériologie permet tout d'abord un gain de temps réel, ce qui devrait permettre un traitement adapté plus précoce, une diminution du nombre de jours d'hospitalisation et au total une baisse significative du coût.

Malgré les imperfections, les techniques usuelles possèdent un avantage décisif de simplification de mise en œuvre et son bien corrélées avec les données cliniques. C'est seulement en cas d'insuffisance de ces technique que la biologie moléculaire doit être utilisée (bactéries non cultivables ou nécessitent un temps d'incubation prolongé, difficulté d'identification) ou pour différencier une souche virulente d'une souche non pathogène.

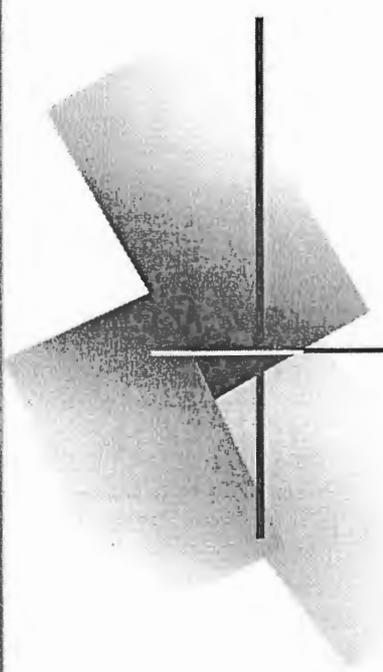
La généralisation des tests de biologie moléculaire ne se fera probablement que lorsque leur d'automatisation sera suffisant pour permettre une réduction des coûts financiers et/ou une économie en personnel.

L'apparition de Kits de génétique (.....) va permettre d'améliorer la standardisation et la reproductibilité des résultats, la nouvelle génération de thermocycleurs est plus rapide : La PCR dans des micro tubes (capillaires) à paroi très fine limitant l'inertie lors des changements de température.

Nous pouvons tout de même observer que l'utilisation de la biologie moléculaire a amélioré le diagnostic de pathologie. (Durand G., Frezet S., 2002-2003).

ANNEXE

- ✓ Biotype : est le profile biochimique des souches de *E.coli* varies en effet par différent autres caractères biochimiques.
- ✓ Génotypique : seules les hybridations DNA-DNA ou RNA-DNA permettent aujourd'hui d'y voir plus clair
- ✓ Lysotype : est le spectre de la sensibilité d'une souche a une collection de bactériophage. cependant, contrairement au typage.
- ✓ Pathovar : est un taxon d'un rang hiérarchique inférieur de la sous espèce et caractérise par son pouvoir pathogène.
- ✓ Phénotypique : définit phénotypiquement *E.coli* serait dire q'un *E.coli* est une entérobactérie qui fermentant le lactose et produisant de l'indole.
- ✓ Serogroupe : est détermine que par l'antigène O.
- ✓ Serotype : est la combinaison des deux antigènes somatique O et flagellaire H
- ✓ Test Elek : cette méthode détecte la toxine diffusible produite par un organisme développé sur un milieu gélosé.



Bibliographies

BIBLIOGRAPHIE

- (1). Avril J L., Dabernal H., Denis F. et Monleil H., 1992, Bactériologie clinique ed. : Ellipses, 2. P : 130, 150,152-154,157.
- (2). Acar J F., Armengaud M., Cherubin C., Grenier B., Mollering J F.Pechère J C.,Sande M., Zinner S., waldevogel ,1983, Les infections, ed.: Mloine S.A, 2 P: 414,425,383.
- (3) : Bengen E., 1999, physiopathologie et diagnostiques bactériologique des méningites néonatales à *Escherichia coli*.Revue : Maladies mitochondriales P : 19,25.
- (4). Berche P., Gaillard J L., Simonet M., 1988, Bactériologie: bactéries des infections humaines, ed: Flammarion médecine-science. P : 102-106, 537,538.
- (5). Bousseboua H., 2002, Eléments de microbiologie générale, ed. : De l'université mentouri, Constantine. P : 117, 118, 125,132.
- (6) : Bouvet J. et Verony-Rosand C. /méthodes génétiques de détection des Esherichia coli verotoxiques (VTEC) et de Esherichia coli O157 :H7dans les aliments/synthèse scientifique (Revue Méd. 2000, 151, 10,907-914). P : 907, 910,911.
- (7) : Denden I., Mehdouani K.etBakhrouf A., 2004, Prévalence et caractérisation des Escherichia coli uropathogènes producteurs de facteur cytotoxique nécrosant type 1(CNF1) dans le centre de la tunisie.ed. : John Libbey eurotext.P : 312,313.
- (8) :Durand G. et Frezet S., 2002-2003,Méthodes microbiologiques au laboratoires de la Biologie moléculaire. Ed : INRA. P :1-12,15-29.
- (9). Etienne J., 1999, Biochimie génétique, Biologie moléculaire. ed. Masson. 5 P :376.
- (10). Leminer L., Verron M., 1982, Bactériologie médicale. Ed. : Flammarion médecine science, 2. P : 395, 396,398-403,405-407.
- (11) : Mainil J., 2003, Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*.ed. : Université de liége. P: 105,106.
- (12) : Mariani-Kurkdjan P., 2004, physiopathologie des infections urinaires, Revue:Médecine thérapeutique/pédiatrie. P : 2,3.
- (13) : Martin C., 2004,*Escherichia coli* producteurs de shiga toxines (STEC) : étude de l'expression des gènes impliqués dans les indicateurs hôte/bactérie afin de cracteriser des marqueurs moléculaires associés aux variant pathogènes pour l'homme. ed. : INRA. P : 15, 16, 20,21.
- (14) : Moustardier G., 1972, Bactériologie medicale.ed. : 4. P: 122,123.
- (15) : Prescott L M., Harley J P. et Klein D A., 2003, Microbiologie. ed.: de boeck, 2. P: 56, 69, 106, 164,507.
- (16). Scriban R., 1999, Biotechnologie. Ed.: TEK, 5 .P: 396, 486, 511,512.
- (17). Serre J L. et coll, 2002, Les diagnostics génétiques. Ed.: Dunod. Biotec.info. P: 42,43.
- (18). Singleton P., 1999, Bactériologie. Ed.: Dunod, 4. P: 163,169,176,184,266,354, 356-363.

(19). Singleton P., 2005, Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologie. Ed.: Dunod, 6. P: 221-223,326-328,378-380.

(20) : Tap J., 2004, caractérisation moléculaires des *Escherichia coli* O111 et diversité des souches isolées en France. ed. : Université Paris XII val de Mahne. P : 1,5-12,15-28.

(A) : http://georges.dolisi.free.fr/microbio/génie_gèn.htm

(B) : <http://lyon-sud.univ-lyon.fr/bacterio/ecolo/E.coli>

(C) : <http://www.bacteriologie.net/generale/mutation.html>

(D) : <http://www.biochimie.univ-paris7.fr/cours/reparation/REPmisappariement.html>

Résumé :

Les techniques traditionnelles utilisées au sein du laboratoire de microbiologie peuvent dans certains cas être avantageusement complétées ou remplacées par les nouvelles techniques de la biologie moléculaire et génétique, qui servent à détecter les gènes codant, les facteurs de pathogénicité ou les marqueurs associés aux sérotypes pathogènes.

Dans notre travail, nous essayons de connaître les mécanismes de pathogénicité et de déterminer les nouvelles techniques qui nous permettent de connaître le fonctionnement des gènes responsables, et éventuellement de les modifier génétiquement afin de stopper les nuisances que causent certaines souches d' *E. coli*.

Mots clés :

Escherichia coli, pathogénicité, anciennes techniques, nouvelles applications, gènes, mutations, réparation

Summary:

The traditional techniques used within the laboratory of microbiology can in certain cases be advantageously supplemented or replaced by the new techniques of molecular biology, genetics, which are used to detect genes coding, factors of pathogenicity or markers associated with the pathogenic serotypes.

In our work, we try to know the pathogenicity mechanisms and to determine the new techniques which allow us to know the operation of responsible genes and if required to modify them genetically in order to stop the harmful effects which certain stocks of *E. coli* cause.

Key words:

Escherichia coli, pathogenicity, old techniques, new applications, genes, changes, repairs.

المخلص:

التقنيات التقليدية المستعملة في مخبر الميكروبيولوجيا يمكن أن تكون في بعض الحالات مكملّة أو مستبدلة بالتقنيات الحديثة للبيولوجيا الجزيئية والوراثية التي تستخدم للكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الأمراض أو المحددات المرتبطة بـ serotype المرض.

في عملنا هذا نحاول معرفة آليات الأمراض وتحديد التقنيات الحديثة التي تسمح لنا بمعرفة وظائف الجينات المسؤولة، واحتمال تعديلها جينياً بهدف إيقاف الأضرار التي تسببها بعض سلالات *E. coli*.

الكلمات المفتاحية:

Escherichia coli، الأمراض، التقنيات القديمة، التطبيقات الجديدة، الجينات، التغيرات،

التعديلات.