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

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCE

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme De Master en sciences biologiques

Spécialité : microbiologie appliquée

Présenté par :

BENGHERBIA Ikram ALIKHOUDJA Kawthar DRIOUCH KELAI Chaimaa

Thème :

Caractérisation moléculaire des isolats d'*Escherichia coli* entérohémorragiques des prélèvements clinique à Médéa

Devant le jury composé de :

-Mr M. RAHAL	M.C.A	Univ. Médéa	Promoteur
-Mr O. SALHI	M.C A	Univ. Blida	Président
-Mme I. AMMAM	Docteur		Examinatrice

Année Universitaire : 2022 /2023

Remerciement

Tous d'abord et avant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant de nous avoir donné la force, la patience et la volonté durant toute ces longues années d'étude pour réaliser ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre gratitude à notre promoteur, Dr RAHAL MOHAMED, pour ces précieuses orientations, sa patience, ses encouragements et sa disponibilité de manière nous la considérés parfaite.

Nous profitons l'occasion pour remercier les membres de jury d'avoir examiné et évaluer notre travail.

Nous remercions tous les enseignants qui nous ont donné tous leurs savoir-faire pendant tout notre cycle universitaire.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, je peux réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie ma mère Amina qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance, courage et sécurité.

A mon cher père Salim qui m'a appris le sens de persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider je lui confirme mon attachement et mon profond respect. Vous êtes pour moi un sujet de fierté.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A ma source de bonheur, mon cher frère Abdel Karim et ma sœur Wissam.

A mon chère grand-père Ahmed et mes grands-mères Soumia et Hamida.

A la mémoire de mon grand-père Abdel Karim.

A ma deuxième sœur, ma tente Yasmine qui n'a jamais été lésiné à m'aider et mon oncle Billel qui sans lequel je n'aurais pas pu accomplir ce travail.

A tous les membres de la famille Bengherbia et Korteby.

À mes chères binômes Chaimaa et Kawthar, qui ont partagé avec moi les moments difficiles ainsi que les moments de joie tout au long de ce travail, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude. C'est avec fierté que nous avons accompli cette tâche ensemble.

A mes chères amies et collègues Nabila, Nour El Houda et Karima.

Ikram

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, je peux réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie ma mère Yasmina qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance, courage et sécurité.

A mon cher père Abderrazak qui m'a appris le sens de persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider je lui confirme mon attachement et mon profond respect. Vous êtes pour moi un sujet de fierté.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mon cher frère Mohamed et mes sœurs Selma, Aya et Sabrina

A ma chère grand-mère Fatiha

A mes tentes Nabila, Samia, Hayat et Naima

A mes oncles Houssine et Mohamed

A mes chères cousines Nesrine, Rania, Nourhane et Fatiha

À mes chères binômes Chaimaa et Ikram, qui ont partagé avec moi les moments difficiles ainsi que les moments de joie tout au long de ce travail, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude. C'est avec fierté que nous avons accompli cette tâche ensemble,

A mes chères amies et collègues Nabila, Nour El Houda et Karima

Kawthar

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, je peux réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie ma mère Hamida qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance, courage et sécurité.

A mon cher père Mahfoud qui m'a appris le sens de persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider je lui confirme mon attachement et mon profond respect. Vous êtes pour moi un sujet de fierté.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mon cher mari Mohamed pour son soutien moral et ses conseils précieux., Merci d'être toujours à mes côtés, je prie Dieu pour qu'il te protège.

A mes chères frères Hamid, Oussama, Mohamed et mes sœurs Alia et fatima.

A mes anges Aya, Imen, Abdellah, Razan et Batoul.

A ma chère grand-mère Aicha qui je souhaite une bonne santé.

A mes tentes, mes oncles et toute ma famille, proche ou éloignée.

A mes chères cousines Amira, Souad, Houda, Malak.

A mes chères binômes Kawthar et Ikram, qui ont partagé avec moi les moments difficiles ainsi que les moments de joie tout au long de ce travail, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude. C'est avec fierté que nous avons accompli cette tâche ensemble,

A mes chères amies et collègues Nabila, Nour El Houda, Karima et Zahra.

Chaimaa

Résumé

Escherichia coli entérohémorragique (EHEC) est une souche pathogène responsable des infections intestinales sévères. Sa capacité à causer des épidémies alimentaires et des infections individuelles en fait un problème de santé publique préoccupant.

Une étude moléculaire a été réalisée sur 20 souches d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) isolées à partir des prélèvements urinaires. Les souches ont été identifiées et caractérisées à l'aide des méthodes biochimiques et d'antibiogrammes standard. La confirmation et l'identification des souches d'EHEC ont été réalisées sur la gélose sélective Mac Conkey sorbitol (SMAC). Toutes les souches ont fait l'objet pour l'extraction d'ADN par technique chimique manuelle, l'ADN extrait a été utilisé pour la PCR conventionnelle pour la détection des gènes de virulence (*stx1*^{a}, *stx2*^{b}, *afa, eae*^{c}, *iroN, ompT, cnf1* et *ipr2*) et de résistance aux antibiotiques (*TEM, cmlA, tet(A), qnr, dfrA1 et aac(3)II)*. Les souches étudiées ont présenté une forte résistance à l'Ampicilline (85%) et à l'Amoxicilline/Acide clavulanique (60%), tandis que leur résistance aux Céphalosporines était plus faible (10% à 25%), ainsi qu'à d'autres antibiotiques tels que la Gentamycine, azithromycine et Fosfomycine de (10% à 45%).

Les résultats de la PCR ont montré la présence de la majorité des gènes de résistance chez la plupart des souches (*TEM (85%), cmlA (70%), tet(A) et dfrA1 (65%))*. En revanche, les gènes de virulence étaient présents avec des proportion variées (*eae*^{c} *(10%), cnf1(*25%), *afa* (35%), *iroN* et *stx1*^{a} (45%) tandis que l'*ompT* était présent à 100%). Selon les résultats de la répartition des génes de virulence les souches ont été classées en 13 clades. Alors qu'en terme de gènes de résistance un clade dominant à 50% et six autres clades émergents avec des proportions variées ont été obtenues. De plus, l'analyse des gènes de virulence et de résistance a montré une grande diversité génétique, regroupant les souches en 17 clades distincts. Cette diversité génétique, principalement liée aux gènes de virulence, suggère une variabilité potentielle dans les sources d'infection et les niveaux de virulence de ces souches.

En conclusion La caractérisation moléculaire des souches d'EHEC permet d'élucider les complications associées à l'infection et d'orienter les stratégies de traitement nécessaire pour prévenir les épidémies et suivre les changements.

Mots clés: EHEC, Caractérisation moléculaire, PCR, Gènes de virulence ,Gènes de résistance

Abstract

Escherichia coli enterohemorrhagic (EHEC) is a pathogenic strain responsible for severe intestinal infections. Its ability to cause foodborne outbreaks and individual infections makes it a concerning public health issue.

A molecular study was conducted on 20 strains of EHEC isolated from urinary samples. The strains were identified and characterized using standard biochemical methods and antibiotic susceptibility testing. Confirmation and identification of EHEC strains were performed on MacConkey sorbitol agar (SMAC). Manual chemical extraction was performed on all strains for DNA extraction, which was then used for conventional PCR to detect virulence genes (*stx1*^{a}, *stx2*^{b}, *afa*, *eae*^{c}, *iroN*, *ompT*, *cnf1*, and ipr2) and antibiotic resistance genes (*TEM*, *cmlA*, *tet(A)*, *qnr*, *dfrA1*, and *aac(3)II*). The studied strains showed high resistance to Ampicillin (85%) and Amoxicillin/Clavulanic acid (60%), while their resistance to cephalosporins ranged from 10% to 25%, as well as to other antibiotics such as Gentamicin, Azithromycin, and Fosfomycin (10% to 45%).

PCR results revealed the presence of the majority of resistance genes in most strains (*TEM* (85%), *cmlA* (70%), *tet(A)*, and *dfrA1* (65%)). In contrast, virulence genes were present with varying proportions (*eae*^{c} (10%), *cnf1* (25%), *afa* (35%), *iroN* and *stx1*^{a} (45%), while *ompT* was present in 100% of the strains). Based on the distribution of virulence genes, the strains were classified into 13 clades. Regarding resistance genes, a dominant clade with a percentage of 50% and six other emerging clades with varying proportions were observed. Furthermore, the analysis of virulence and antibiotic resistance genes revealed significant genetic diversity, grouping the strains into 17 distinct clades. This genetic diversity, primarily associated with virulence genes, suggests potential variability in infection sources and virulence levels of these strains.

In conclusion, the molecular characterization of EHEC strains allows elucidation of infection-associated complications and guides necessary treatment strategies to prevent outbreaks and monitor changes.

Key words: EHEC, Molecular characterization, PCR, Virulence genes, Resistance genes

الملخص

Escherichia coli entérohémorragique (EHEC)هي سلالة ممرضة مسؤولة عن العدوى الشديدة في الأمعاء. قدرتها على التسبب بوباءات غذائية وعدوى فردية يجعلها مشكلة صحية عامة مقلقة.

تم إجراء دراسة جزيئية على 20 سلالة من عينات البول المعزولة (EHEC) ، تم تحديد وتمييز السلالات باستخدام الطرق البيوكيميائية القياسية واختبارات الحساسية للمضادات الحيوية. كما تم اجراء تحديد وتأكيد السلالات EHEC في وسط زرع انتقائي Mac Conkey sorbitol (SMAC). كما تم إخضاع جميع السلالات لاستخلاص الحمض النووي بطريقة كيميائية يدوية ، وتم استخدام الحمض النووي المستخرج من أجلPCR للكشف عن الجينات الممرضة (*stx1*^{a}, *stx2*^{b}, *afa, eae*^{c}, *iroN, ompT, cnf1* et *ipr2*) وجينات مقاومة المضادات الحيوية (*TEM, cmlA, tet(A), qnr, dfrA1 aac(3)II*). أظهرت السلالات المدروسة مقاومة قوية للأمبيسيلين (85٪) ولأموكسيسيلين / حمض الكلافولانيك (60٪) ، بينما كانت مقاومتها للسيفالوسبورينات أضعف (10٪ إلى 25٪) ، وكذلك لمضادات حيوية أخرى مثل الجينتامايسين ، أزيثروميسين وفوسفوميسين (10٪ إلى 45٪).

أظهرت نتائج PCR وجود غالبية جينات المقاومة في معظم سلالات (*TEM (85%), cmlA (70%), tet(A)et dfrA1 (65%)).* في المقابل ، كانت الجينات الممرضة موجودة بنسب متفاوتة (*eae*^{c} *(10%), cnf1(*25%), *afa* (35%), *iroN* et *stx1*^{a} (45%) في حين أن l'*ompT* كان موجودا بنسبة 100% . استنادًا إلى نتائج توزيع الجينات الممرضة، تم تصنيف السلالات في 13 مجموعة. بينما فيما يتعلق بجينات المقاومة، تم الحصول على مجموعة سلالية مهيمنة تشكل 50% وست مجموعات سلالية ناشئة أخرى بنسب متفاوتة. علاوة على ذلك، أظهر تحليل الجينات الممرضة والمقاومة تنوعًا جينيًا كبيرًا، حيث تم تجميع السلالات في 17 مجموعة سلالية مميزة. يشير هذا التنوع الجيني المرتبط بشكل أساسي بالجينات المرضة ، إلى تنوع محتمل في مصادر العدوى ومستويات االخطورة لهذه السلالات.

في الختام، يمكن للتمييز الجزيئي لسلالات EHEC أن يساهم في توضيح المضاعفات المرتبطة بالعدوى وتوجيه استراتيجيات العلاج اللازمة لمنع الوباءات وتتبع التغيرات.

Table des matières

Introduction 1
I/ Généralités 2
I.1. Généralité sur Escherichia coli et EHEC : 2
I.1.1. Caractères antigéniques : 3
I.1.2. Le pouvoir pathogène: 3
I.2. Escherichia coli entérohémorragique : 5
I.2.2. Les facteurs de virulence: 7
II/ Les antibiotiques: 10
II.1. L'antibiogramme : 10
II.2. Définition des antibiotiques : 10
II.3. Classification des antibiotiques : 10
II.3.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne : 10
II.3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique 14
II.3.3. Antibiotiques actifs sur les acides nucléiques 15
II.4. Résistance acquise : 16
II.5. Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) : 17
II.5.1. Les bêta-lactamases de type TEM : 17
III/ Biologie moléculaire: 18
III.1. L'extraction de l'ADN : 18
III.2. La réaction de polymérisation en chaine (PCR) : 18
III.2.1. Les composants du Mix PCR : 19
III.3. Les gènes de virulence : 21
III.3.1. Gène *STX* : 21
III.3.2. Gène *eae* : 23
III.3.3. Gène *cnf1*: 25
III.3.4. Gène *afa* : 26
III.3.5. Gène ompT: 26
III.4. Les gènes de résistance aux antibiotiques : 27
III.4.1. Gène tet(A): 27
III.4.2. Gène *TEM* : 28
III.4.3. Gène *qnr*: 28
III.4.4. Gène *dfrA1* : 29
IV/ Epidémiologie 30

IV.1. Epidémiologie 30
IV.1.1. Europe : 30
IV.2. Les gènes de virulence :.....31
IV.2.1. Gènes Stx1[a] et stx2[a]:.....31
IV.2.2. Les gènes *cnf1* et *afa* : 36
IV.3. Gène Ipr2 : 37
IV.4. Les gènes de résistance aux antibiotiques : 37
IV.4.1. TEM: 37
IV.4.2. CmlA, qnr, dfrA1, tet(A) : 38
V/ Matériels et méthodes 40
V.1. Problématique :.....40
V.2. Type et période d'étude :.....40
V.3. Cadre d'étude :.....40
V.4. Critères d'inclusion : 40
V.5. Matériels et méthodes : 40
V.5.1. Les souches étudiées : 40
V.5.2. Repiquage sur milieu MacConkey sorbitol (SMAC) : 40
V.5.3. Conservation des souches : 41
V.5.4. Enrichissement: 41
V.5.5. Ensemencement sur milieu Hektoen : 42
V.5.6. Biologie moléculaire:.....43
V.6. Résultats 54
V.6.1. Répartition des résultats d'infection par *Escherichia coli* entérohémorragique selon l'âge et le sexe 54
V.6.2. Résultats d'antibiogrammes: 55
V.6.3. Biologie moléculaire.....56
Discussion 65
Conclusion générale 70

Liste des tableaux

Tableau I.1: ..... propriétés des souches pathogènes intestinaux et extra intestinaux. 4

Tableau II.1:.....Classification des pénicillines 11

Tableau II.2:..... Classification des Céphalosporines et monobactames 13

Tableau IV.1:..... Epidémiologie des gènes stx1, stx2 et eae^{c} en différents pays. 35

Tableau IV.1:.....Epidémiologie des gènes cmlA, tet(A), dfrA1, qnr dans differents pays 38

Tableau V.1: .....Préparation pour 1L du milieu LB. 43

Tableau V.2: .....composants pour SDS 10%. 44

Tableau V.3: ..... composants pour la preparation d'EDTA. 44

Tableau V.4: ..... composants pour la préparation de Tris-Cl. 45

Tableau V.5: .....composants pour la préparation du TE buffer (tampon Tris-EDTA). 46

Tableau V.6: .....Amorces utilisées en PCR et températures de fusion correspondantes. 51

Tableau V.7: .....Diversité génétique des gènes de virulence et de resistance. 60

Tableau V.8: ..... Diversité génétique des gènes de virulence. 61

Tableau V.9: ..... diversité génétique des gènes de resistance. 62

Tableau V.10: . Résultats du phénotype de résistance vis-à-vis les bêtalactamines et le génotype (gène TEM). 63

Tableau V.11: ..... Résultats du phénotype de résistance vis-à-vis les quinolones et les aminoglycoside et le génotype (gène TEM). 64

Liste des figures

Figure I.1: .....Diagramme de Venn de la classification des E. coli pathogènes typiques 3

Figure I.2: ..... Schéma illustre la transmission et les différents réservoirs principaux d'EHEC O157:H7.....6

Figure I.3: .....le locus d'attachement et d'effacement des entérocytes (LEE) des EHEC et le système de sécrétion du type III (TTSS) qu'il code 7

Figure II.1:.....Classification des tetracyclines 15

Figure III.1:.....la régulation de l'expression de gène stx2 chez le bacteriophage 933W de la souche O157: H7 EDL933.....21

Figure III.2:.....Structure du LEE d'E. coli O157:H7 24

Figure III.3:..... Organisation génétique et structurelle des groupes de gènes afa 26

Figure IV.1:..... Épidémies à EHEC survenues depuis 2006 en Europe et publiées dans la littérature internationale.....31

Figure V.1: ..... colonies d'EHEC sur milieu MacConkey (milieu jaune et colonies incolores ou beiges (EHEC) et (milieu rose a rougeâtre et colonies rose (*E. coli* non entérohémorragique) 41

Figure V.2: .....Enrichissement des souches d'EHEC dans le milieu BHIB 42

Figure V.3: .....Repiquage des souches sur milieu Hektoen 42

Figure V.4: .....Préparation du milieu LB (Luria-Bertani) 43

Figure V.1: ..... Préparation de Tris-Cl 45

Figure V.6:.....phénol 46

Figure V.7: .....les étapes d'extraction d'AND 47

Figure V.8: ..... A: thermocycleur. B: Barrettes contenant le melange reactional 51

Figure V.9: .....électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des résultats 53

Figure V.10: ..... A. Distribution globale des souches d'EHEC selon le sexe B. Répartition des résultats d'infection par EHEC selon le sexe et l'âge. 54

.....55

Figure V.11: ..... Profil de résistance d’EHEC vis-à-vis les Beta-lactamines. 55
Figure V.12: .....Profil de résistance d’EHEC aux différents antibiotiques 56
Figure V.13: .....Répartition des gènes de résistance aux antibiotiques chez EHEC. 57
Figure V.14:..... Résultat de l'électrophorèse du gène dfrA1 57
Figure V.15: .....Résultat de l'électrophorèse du gène TEM 58
Figure V.16: ..... Résultat de l'électrophorèse du gène tet(A) 58
Figure V.17: ..... Répartition des gènes de virulence chez EHEC. 59
Figure V.18: ..... Résultat de l'électrophorèse du gène ompT 59
.....60
Figure V.19: ..... Résultat de l'électrophorèse du gène afa 60

Liste des abréviations

EHEC : Escherichia coli entérohémorragique.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

STEC : Escherichia coli producteurs de shigatoxines.

APEC : *E. coli* pathogènes aviaires.

IntEC : *E. coli* pathogènes intestinaux.

ExPEC : E. coli pathogènes extra-intestinaux.

ETEC : E. coli entéro-toxinogène.

EPEC : E. coli entéropathogène.

EAEC : E. coli entéro-aggrégatif.

EIEC : E. coli entero-invasifs.

DAEC : E. coli à adhérence diffuse.

NMEC : Neonatal meningitis Escherichia coli.

SHU: syndrome hémolytique urémique.

LEE : Locus d'attachement et d'effacement.

TTSS : Système de sécrétion de type III.

A/E : Attaching and effacing.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice**.**

PGN : Le peptidoglycane.

PLP : protéines liant les pénicillines.

CAM : Les chloramphénicols.

SDS : dodécylsulfate de sodium.

TE : tampon Tris-EDTA.

DNTPs : désoxyNucléotides-Triphosphates.

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

Stx : Shiga-toxine.

Tir : Translocated Intimin Receptor.

CH: colite hémorragique.

SMAC : milieu MacConkey sorbitol.

BHIB : Brain Heart Infusion.

LB : Luria-Bertani.

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique.

TE buffer : tampon Tris-EDTA.

TBE : Tris, Borate, EDTA.

Introduction générale

Introduction

Escherichia coli entérohémorragique (EHEC), une souche pathogène de la bactérie *E. coli*. Cette bactérie est responsable d'environ 22 % des cas d'infections intestinales sévères et hémorragiques dans le monde (Khanifar et al. 2019) tels que la diarrhée et la colite hémorragique, qui peuvent évoluer vers le syndrome hémolytique et urémique. Ces complications représentent un grave problème mondial de santé publique qui nécessite des interventions de santé publique laborieuses et des mesures de contrôle de la sécurité pour lutter contre les épidémies récurrentes dans le monde (Sanchez-Villamil, Tapia, and Torres 2019).

L'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) a été impliquée dans plusieurs épidémies majeures à travers le monde, notamment l'épidémie marquée aux États-Unis en 1982 (Lemaignen et al. 2013) et celle au Japon en 1996, touchant plus de 9000 personnes (Loukiadis et al. 2012). Ces événements soulignent l'importance cruciale de mener des études épidémiologiques approfondies afin de réduire la prévalence de ces infections et de minimiser leur impact sur la santé publique. En comprenant mieux les caractéristiques épidémiologiques de l'EHEC, il est possible de mettre en place des mesures préventives et des stratégies de contrôle plus efficaces pour protéger la population contre cette infection grave.

Cependant, il existe peu d'études moléculaires mettant en évidence la caractérisation des souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques, comme celle réalisée par (Salih et al. 2014) sur des souches isolées à partir de viande bovine congelée.

L'objectif principale de cette recherche est de réaliser la caractérisation moléculaire des souches d'EHEC isolées à partir des prélèvements urinaires des patients dans la région de Médéa. Cela comprendra l'identification des souches EHEC parmi les souches d'*Escherichia coli*, l'analyse de la présence des gènes de virulence spécifiques, ainsi que les gènes de résistance aux antibiotiques par la méthode de PCR conventionnelle afin d'examiner la diversité génétique et les facteurs de virulence associés aux souches circulantes dans cette région.

Généralités

I/ Généralités

I.1. Généralité sur *Escherichia coli* et EHEC :

Escherichia coli a été isolée pour la première fois en 1884 à partir des fèces de nouveau-nés humains (Shumi Gebisa 2019) par le microbiologiste et pédiatre allemand Theodor Escherich (Blount 2015).

La majorité des souches d'*Escherichia coli* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux mais peuvent évoluer en *E. coli* pathogènes en acquérant des facteurs de virulence (Shumi Gebisa 2019) et provoquent des pathologies intestinales ou extra intestinales (Gadou et al. 2019), les souches pathogènes peuvent être classées en fonction des sérogroupes, des mécanismes de pathogénicité, des symptômes cliniques ou des facteurs de virulence (Shumi Gebisa 2019).

E. coli entérohémorragique O157: H7 , une souche productrice de Shiga-toxine (STEC) est l'un des principaux pathogènes d'*E. coli* (Rani et al. 2021). Le premier isolement d'*E. coli* O157: H7 a eu lieu en 1975 aux États-Unis chez une femme californienne souffrant de diarrhée sanglante, tandis que le premier cas signalé chez le bétail était en Argentine en 1977, alors qu'en 1982 elle a été identifiée en tant que pathogène humain (Shumi Gebisa 2019).

Selon le Bergey's manual 2012 **:** *E. coli* est l'organisme infectieux le plus répandu dans la famille des bactéries à Gram négatif (Shumi Gebisa 2019). Il s'agit d'un germe aéro-anaérobie facultatif, non exigeant (culture facile sur milieu ordinaire), mésophile (température de croissance 37°C), et neutrophiles qui se développent à un pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7, non halophile (elle pousse en milieu de concentration en NaCl inférieure à 0,2 M) (Khalfoune Asma, 2014). Ses colonies sur les milieux gélosés sont rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre. Sur le milieu MacConkey, les colonies d'*E. coli* lactose positif sont de forme plate en couleur rose rougeâtre et ont un aspect sec, tandis que les colonies lactose négatif sont incolores. Sur le milieu Hektoen, les colonies sont de couleur saumon. Sur la gélose au sang, les colonies d'*E. coli* sont rondes, translucides, parfois hémolytiques et non pigmentées (LADJAL and BAGHDADI 2021).

Escherichia coli entérohémorragique partage les mêmes caractères biochimiques avec les autres *E. Coli* sauf le sorbitol et β-glucuronidase sont négatifs (SAVOYE 2011).

I.1.1. Caractères antigéniques :

Il existe quatre types d'antigènes chez *E. coli*, l'antigène somatique O (antigène de paroi) qui correspond aux polyosides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS) (Gadou et al. 2019), cet antigène est thermostable (Maiga 2006); l'antigène capsulaire K qui groupe trois variétés d'antigène de surface : l'antigène L d'enveloppe thermolabile qui possède une activité hémolytique et nécrotique, l'antigène A capsulaire thermostable, l'antigène B d'enveloppe ou de surface qui est thermolabile (Maiga 2006); l'antigène flagellaire H de nature protéique, constitué de flagelline et l'antigène de surface F des *fimbriae* présents chez les souches ayant des propriétés d'adhésion (Gadou et al. 2019).

I.1.2. Le pouvoir pathogène :

E. coli est le micro-organisme responsable de plusieurs pathologies également responsable des infections nosocomiales, notamment des infections des plaies chirurgicales et des bactériémies (Gadou et al. 2019). Les souches pathogènes d'*E. coli* sont nommés selon le syndrome clinique qu'ils provoquent par exemple : *E. coli* diarrhéique (DEC) et parfois selon l'hôte cible comme *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) (Shumi Gebisa 2019).

Il existe deux grands groupes des souches d'*E. coli* pathogènes en fonction du type d'infection dont elles sont à l'origine : *E. coli* pathogènes intestinaux (IntEC) qui comprennent six groupes pathogènes ou pathovars et *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) (Tableau I.1) (Gadou et al. 2019).

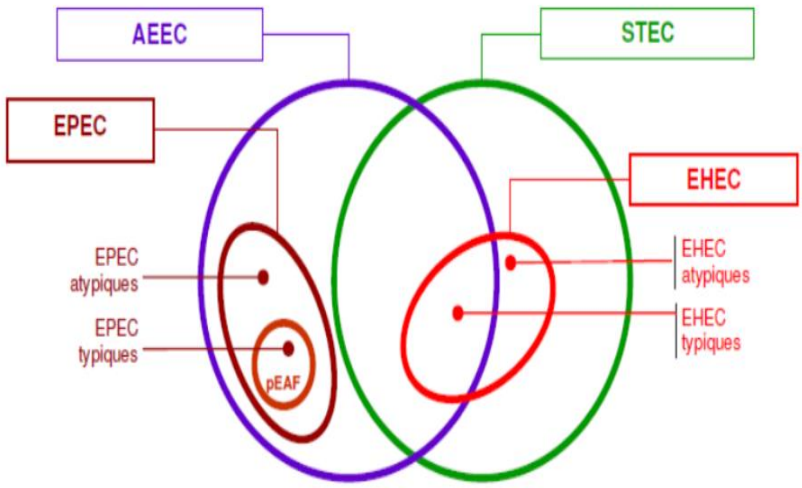


Figure I.1: Diagramme de Venn de la classification des E. coli pathogènes typiques (Ezhvin 2017).

Le tableau 1 ci-dessous représente quelques propriétés des souches pathogènes intestinaux et extra intestinaux :

Tableau I.1: propriétés des souches pathogènes intestinaux et extra intestinaux.

***E. coli* pathogène**	**IntEC** origine de syndromes diarrhéiques (Gadou et al. 2019).	**ETEC** – Responsables de diarrhées infantiles et de diarrhée du voyageur. Sécrétion d'entérotoxines thermolabiles et/ou thermostable – Ils sont présents essentiellement dans la partie proximale de l'intestin grêle (Gambushe, Zishiri, and El Zowalaty 2022).
		EHEC – Responsables du colite hémorragique(CH) avec une diarrhée sanglante et du SHU (Gambushe et al. 2022). – Souches productrices de Shiga toxine(possède le gène *stx*) avec une forte adhérence à la surface de l'iléon distal du cæcum et du colon droit (Gadou et al. 2019).
		EPEC – Responsables de diarrhées infantiles particulièrement chez les enfants <3 ans. – Ils ont la capacité à adhérer aux entérocytes de l'intestin grêle et induit des lésions histopathologiques qui sont caractérisés par l'effacement des microvillosités intestinales (SAVOYE 2011).
		EAEC – La cause d'une diarrhée aigue et persistante et un retard de croissance chez les enfants dans les pays en voie de développement (Boisen et al. 2020).
		EIEC – Responsables de syndrome dysentérique proche de la shigellose. – Elle des capacités à envahir les cellules épithéliales du colon (Farajzadeh-Sheikh et al. 2020).
		DAEC – Responsables de diarrhées et d'infections urinaires. – Ils sont caractérises par un phénotype d'adhésion diffuse assuré par l'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe (SAVOYE 2011).
	ExPEC - origine d'infections du tractus urinaire, de méningites et de	**UPEC** – Ils sont responsables de plus de 80% des infections urinaires chez l'homme. – La cause de la majorité des bactériuries asymptomatiques, cystites et de pyélonéphrites (Gupta et al. 2021).
		NMEC – Ils ont la capacité de survivre dans le sang et à envahir les méninges chez les enfants provoquant des méningites. – Ils ont un taux de mortalité élevé chez les nouveaux nés (10–30 %) (Wijetunge et al. 2015).

	septicémies(Gadou et al. 2019).	**APEC** – Provoque diverses infections locales et systémiques chez les volailles comme les péricardites, périhépatites. – Ces pathogènes sont responsables d'importantes pertes économiques au seins des industries des volailles (Kathayat et al. 2021).

I.2. *Escherichia coli* entérohémorragique :

Escherichia coli entérohémorragique est un agent pathogène d'origine alimentaire (Berger et al. 2019) considéré comme un sous-type d'*E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) (Govindarajan et al. 2020), qui colonise l'épithélium du colon humain et des ruminants (Wale et al. 2021) et provoque des infections gastro-intestinales (GI) (Warr et al. 2019) avec environ 2,8 millions de cas dans le monde (Berger et al. 2019). EHEC a une dose infectieuse très faible (10 à 100) par rapport à d'autres agents pathogènes intestinaux. Elle est la cause majeure de diarrhées sanglantes, de colites hémorragiques (CH) et du syndrome hémolytique urémique (SHU) (Bardiau M. 2005). EHEC est également associé à de nombreuses épidémies d'origine alimentaire dans les pays développés (Pakbin, Brück, and Rossen 2021).

Le sérotype EHEC O157:H7 est considéré comme l'un des principaux responsables du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe et dans le monde (Bibbal et al. 2022). En France, les cinq sérotypes d'EHEC les plus fréquemment associés aux épidémies et infections humaines sont O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28. Ces souches, communément appelées "EHEC du top 5" ou "EHEC typiques majeures", possèdent les gènes *stx* et *eae* (Ezhvin 2017). Les EHEC "atypiques", tels que les sérogroupes O91 et O104, dont O104:H4 étant responsable de deux épidémies en Allemagne et en France en 2011 (Brugère et al. 2012).

Les EHEC sont principalement transmis aux humains par l'ingestion d'aliments et d'eau contaminés. Les épidémies à EHEC se produisent généralement par voie féco-orale, par transmission de personne à personne, contact avec des animaux et consommation d'aliments insuffisamment cuits tels que des produits de viande sous-cuits, de jus de pomme non pasteurisé, de lait cru et même de farine crue récemment identifiée comme source d'épidémies à EHEC (Figure I.2) (Pakbin et al. 2021). EHEC a une période d'incubation qui varie de 8 heures à 16 jours, mais qui dure généralement de trois à quatre jours. Au cours de cette période, la bactérie passe par plusieurs étapes d'infection, notamment l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte, la colonisation, la production et la libération de Shiga toxine. La bactérie doit

initialement adhérer aux microvillosités ce qui induit l'expression des gènes du TTSS situés sur le LEE et entraîne la synthèse et l'assemblage des protéines TTSS. Les protéines effectrices sont transportées à travers le canal TTSS et dans le cytoplasme de la cellule hôte, où elles modifient les schémas normaux de transduction des signaux de la cellule hôte pour faciliter l'adhésion bactérienne (Eshetu Shumi Gebisa, Minda Asfaw Gerasu 2019).

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) provoquent une réorganisation du cytosquelette de la cellule hôte, entraînant la disparition des microvillosités. Les bactéries adhèrent superficiellement à la cellule hôte, puis se fixent intimement grâce à l'intimine et son récepteur spécifique Tir (translocated intimin receptor). L'intimine associé à Tir, provoque un réarrangement plus important du cytosquelette de l'hôte, formant des piédestaux caractéristiques de la lésion A/E. Les EHEC colonisent avec succès l'hôte en envahissant la microflore intestinale normale et en libérant les Shiga toxines dans la lumière intestinale (Eshetu Shumi Gebisa, Minda Asfaw Gerasu 2019). Les Shiga-toxines produites endommagent les vaisseaux sanguins du côlon, provoquant une diarrhée hémorragique. Ces toxines peuvent entrer dans la circulation sanguine, ciblant les cellules endothéliales des intestins, des reins et du cerveau. Cela peut entraîner des lésions rénales et cérébrales, conduisant à long terme au syndrome hémolytique et urémique (SHU) et au purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) (Gouali et al. 2019).

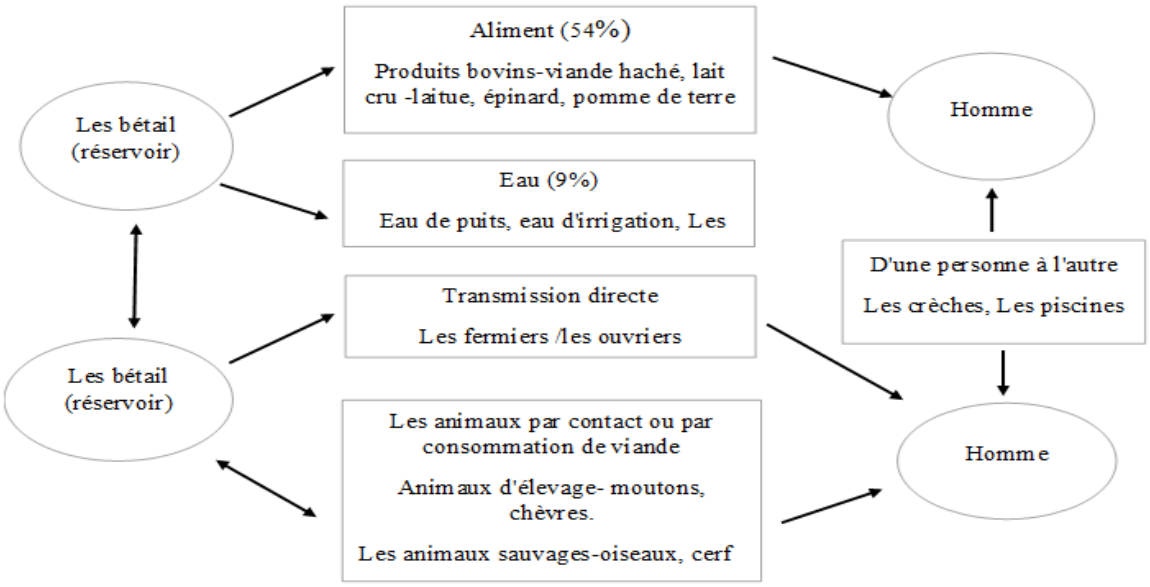


Figure I.2: Schéma illustre la transmission et les différents réservoirs principaux d'EHEC O157:H7 (Gambushe et al. 2022).

I.2.2. Les facteurs de virulence :

I.2.2.1. Les Shiga toxins :

Les Shiga toxines (Stx) sont les facteurs de virulence essentiels des EHEC (cette toxine est détaillée dans la partie biologie moléculaire).

I.2.2.2. Le Locus d'attachement et d'effacement (LEE) :

La physiopathologie des EHEC implique leur colonisation du tube digestif, caractérisée chez les EHEC typiques par la formation de lésions d'attachement-effacement (A/E) sur les cellules intestinales. Ces lésions résultent de facteurs de virulence codés par des gènes situés sur un îlot de pathogénicité chromosomique appelé "Locus of Enterocyte Effacement" (PAI-LEE), présent dans toutes les souches d'EHEC (Michèle 2016). Le LEE est caractérisé par trois régions majeures (Figure I.3) :

1. Système de sécrétion de type III (TTSS) : qui a une structure complexe constituée de multiples sous-unités, chacune étant composée d'environ 20 protéines bactériennes. Les protéines structurelles constituent l'appareil TTSS, tandis que les protéines translocateurs ont pour rôle de transférer un ensemble de protéines supplémentaires, appelées effecteurs, dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ces effecteurs induisent des changements dans les cellules hôtes, permettant à l'agent pathogène d'envahir, se multiplier et parfois de persister chroniquement dans l'hôte. L'appareil TTSS se compose de deux anneaux qui permettent un passage continu à travers les membranes interne et externe, y compris la couche de peptidoglycane (Coburn et al. 2007).

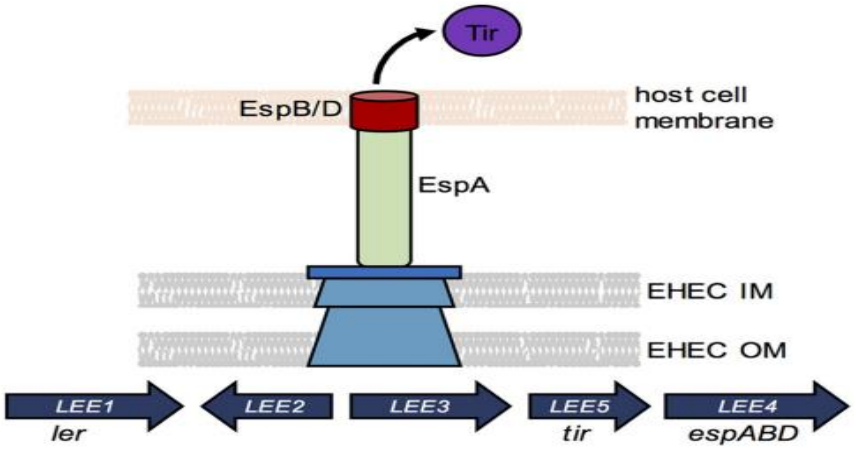


Figure I.3: le locus d'attachement et d'effacement des entérocytes (LEE) des EHEC et le système de sécrétion du type III (TTSS) qu'il code (Elizabeth A. Cameron, Vanessa Sperandio 2020).

Le LEE est constitué de cinq opérons, LEE1-LEE5, contenant tous les gènes nécessaires à l'appareil de sécrétion de type III. Le translocon EHEC T3SS est composé d'EspA qui forme le filament, et d'EspB et d'EspD qui forment un pore dans la membrane de la cellule cible à

travers lequel les protéines effectrices, telles que Tir, sont injectées dans les cellules hôtes. IM: membrane interne ; OM: membrane externe (Elizabeth A. Cameron, Vanessa Sperandio 2020).

2. Une région d'adhésion qui est l'intimine : Le gène *eae*, faisant partie du LEE, est un facteur de virulence important car il code pour l'intimine, une protéine de la membrane externe qui permet l'adhésion étroite entre la bactérie et l'entérocyte. L'intimine existe sous plusieurs sous-types et variants, dont certains sont spécifiques aux souches EHEC notamment γ et ε, tandis que d'autres sont retrouvés chez les EPEC ou des AEEC d'origine animale et non pathogènes pour l'homme. Il semble que les diverses variants de l'intimine présentes dans les EHEC typiques et autres AAEC ont un impact sur le tropisme cellulaire et la spécificité du site de colonisation de la muqueuse intestinale chez l'hôte (Michèle 2016).
3. Plusieurs protéines sécrétées (Esp) : Les protéines sécrétées sont impliquées dans la modification du signal de transduction au niveau de la cellule hôte lors de la formation des lésions A/E. Les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de sécrétion de type III (SAVOYE 2011) (Michèle 2016).

I.2.2.3.Le plasmide de virulence des EHEC :

En plus des gènes *stx* et LEE présents sur le chromosome bactérien, d'autres facteurs, tels que le plasmide de virulence pO157, pourraient jouer un rôle dans la pathogénie des EHEC. Ce plasmide est présent dans les souches d'*E. coli* O157: H7, ainsi que dans certaines souches O26: H11 et d'autres STEC isolées chez les humains, et sa taille peut varier de 70 à 200 kb pour ces sérotype. D'après des recherches épidémiologiques, il existe une forte association entre la présence du plasmide de virulence des EHEC et l'apparition du SHU chez les patients. Le pO157 actuel est le résultat de l'intégration de fragments génétiques provenant de différentes origines et évolutions dans un plasmide de type "F-like". Il contient 100 séquences ouvertes de lecture (ORFs), dont 43 présentent des similitudes avec des protéines et des fonctions connues. Parmi ces 100 ORFs, 35 protéines sont suspectées d'être impliquées dans la pathogenèse des infections causées par les EHEC O157: H7, et 19 gènes ont été caractérisés. Les gènes les mieux étudiés sont : le gène de l'entérohémolysine A (ehxA), d'une adhésine putative (toxB), de la catalase peroxylase (katP), d'une sérine protéase (espP), d'un appareil du système de sécrétion de type II (etp), d'un zinc métalloprotéase (stcE) et d'un fragment conservé eae (ecf) (Michèle 2016).

I.2.2.4.Entérohémolysine A (*ehxA*) :

L'entérohémolysine A, codée par le gène *ehxA* situé sur le plasmide ehxCABD est le facteur de virulence initial identifié sur le pO157, présent dans la plupart des souches O157 : H7 et des STEC non-O157. Cette cytotoxine de la famille des cytotoxines appelées « Repeats in ToXin » (RTX) peut créer des pores et sa préservation chez divers sérotypes d'EHEC est bien documentée. Son rôle précis reste incertain, mais il est suggéré que la lyse des érythrocytes par l'entérohémolysine A libère de l'hème et de l'hémoglobine, pouvant servir de source de fer pour la bactérie. Ainsi, cela pourrait favoriser la croissance d'*E. coli* O157:H7 et l'infection de l'hôte (Michèle 2016).

I.2.2.5. Adhésine putative (toxB):

L'adhésine putative (toxB) joue un rôle dans l'adhésion d'*E. coli* O157: H7 à la cellule épithéliale cible en stimulant la sécrétion des protéines codées par le TTSS (Ezhvin 2017).

I.2.2.6.Facteurs d'adhésion autres que ceux codés par le *LEE* :

Certaines souches LEE-négatives sont généralement non pathogènes, mais certaines d'entre elles, connues sous le nom d'EHEC atypiques, ont été associées à des cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ces souches atypiques utilisent des facteurs d'adhésion différents, tels que l'adhésine Saa dans la souche STEC O113:H21 (98NK2), et l'adhésine AA dans la STEC O111:H2, pour coloniser efficacement la muqueuse colique et causer le SHU chez les patients concernés (Brugère et al. 2012) (Michèle 2016). D'autres adhésines ont été identifiées chez des souches EHEC typiques et atypiques, classées en adhésines fimbriaires et non fimbriaires. L'adhésine EfaI (non fimbriaire) est codée par le gène *efa1* (« EHEC factor for adherence »), qui appartient à un locus de 15 kb indépendant du *LEE* (Michèle 2016).

I.2.2.7.Les « O Islands »:

Les STEC responsables d'épidémies et de SHU possèdent des îlots de pathogénicité spécifiques (O Islands) absents chez les *E. coli* non pathogènes. Les OIs ont été associés à des épidémies et à des maladies graves. Selon l'étude de Shen et de ses collègues, la présence des quatre OIs - OI-1, -47, -141 et -154 - est liée à la capacité de ces souches à coloniser les tractus digestifs humains et animaux (Brugère et al. 2012).

Les antibiotiques

II/ Les antibiotiques :

II.1. L'antibiogramme :

L'antibiogramme consiste à prédire la sensibilité ou la résistance d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques dans un but essentiellement thérapeutique. Il existe deux techniques de réalisation d'un antibiogramme (Jehl, Chabaud, and Grillon 2015):

1. La diffusion en milieu gélosé ou « méthode des disques » : (cette technique est détaillée par (Jehl et al. 2015)).
2. La dilution en milieu liquide : sert à mesurer des CMI par des techniques de bandelettes à gradient de concentration et à les comparer à des concentrations critiques. Elle s'agit d'une méthode de référence (Jehl et al. 2015).

II.2. Définition des antibiotiques :

Agents antimicrobiens qui traitent ou préviennent les infections bactériennes ou celles causées par des champignons pathogènes, ils n'ont pas d'activité sur les virus, ils sont d'origines naturelles, semi- synthétiques ou synthétiques. Ils sont soit bactéricides c'est-à-dire tuent les bactéries ou bactériostatiques qui inhibent leurs croissances et développements (Jafari Ozumchelouei et al. 2020). Les antibiotiques sont classés en différents groupes selon leurs propriétés physicochimiques et leurs modes d'action (Jafari Ozumchelouei et al. 2020).

II.3. Classification des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur structure chimique, spectre d'action et mode d'action (Ebimieowei Etebu 2016). Selon leur mode d'actions les antibiotiques sont classés :

II.3.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne :

II.3.1.1. Les bêtalactamines :

Les bêtalactamines constituent la plus grande famille des antibiotiques possédant le noyau bêta lactame dans leur structures moléculaires, cette classe d'antibiotiques agit sur la synthèse de la paroi bactérienne qui conduit à la lyse et la mort bactérienne (Ibrahim et al. 2019).

a. Mécanisme d'action des β-lactamines :

Le peptidoglycane (PGN) est un composant essentiel de la paroi cellulaire bactérienne, c'est un polymère composé de l'Acide N-acétyle-muramique alternant avec le N-acétyle-glucosamine. La synthèse des peptidoglycanes est assurée par deux enzymes essentielles Transpeptidase et D-alanine carboxypeptidase dites aussi protéines liant les pénicillines

(PLP/PBP) à cause de leurs capacités a lié les pénicillines et les céphalosporines. La présence d'une analogie structurale entre le noyau beta lactame et le substrat naturel des PLP favorise la fixation des bêtalactamines avec les PLP (Lima, Silva, et al. 2020). Une fois fixé, les bêtalactamines provoquent une déstructuration du peptidoglycane et la libération de l'acide lipoteichoïque qui mettent en jeu le système autolytique bactérien (Konaré 2018).

b. Classification des bêtalactamines :

Les β-lactamines ont un effet bactéricide, elles sont considérés comme la famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans la pratique clinique courante surtout dans le traitement des infections dues aux Entérobactéries (ZRARDI.2020) pour leur large spectre antibactérien, leur faible toxicité et le vaste choix de molécules disponibles (KANSAYE, 2020). selon leurs structure chimique ils sont répartie en trois grands groupes : les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique(les pénicillines et les carbapénèmes), les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique (les céphalosporines) et les monobactames (Tableau II.1) (Konaré, 2018).

Tableau II.1: Classification des pénicillines (Lima, Nascimento, et al. 2020) (Mohammedi 2012).

Noyau	Sous-groupe	DCI + voie d'administration	Spectre d'activité
Pénam (ou pénicillines)	Pénicilline G et ses dérivés	Parentérales : – Benzyl Pénicilline (péni G) – Benzyl Pénicilline-procaine – Bénéthamine-benzylpénicilline – Benzathine- benzyl pénicilline Orales : – Phénoxy méthyle pénicilline (pénicilline V) – Clométocilline	– Un spectre étroit. Actif sur Bactéries Gram + : – Streptocoques bêta-hémolytiques (groupe A, B, G) – *Streptococcus pneumoniae* – *Bacillus anthracis* Bactéries Gram- : Neisseria (surtout le méningocoque).
	Pénicillines M (anti staphylococciques)	Parentérales : – Méthicilline Orales : – Oxacilline – Isoxazolyl-pénicillines : Cloxacilline, Dicloxacilline, Flucloxacilline.	Staphylocoque producteur de pénicillinase. Staphylocoque MRSA- (sensibles à l'Oxacilline)
	Pénicillines à large spectre	Parentérales (I.M, I.V) et Orale : – Aminopénicillines : - Ampicilline - Dérivés de l'ampicilline : • Bacampicilline,Métampicillin Pivampicilline,	-Possèdent un spectre large par apport aux premières pénicillines. -Active sur les bactéries $Gram^+$ non productrices de betalactamases et $Gram^-$ *(N. gonorrhoeae, N. meningitidis, H.*

		• Amoxicilline, Epicilline	*influenzae, T. pallidum, Leptospira spp., E. coli, Salmonella spp., Shigella spp.* et *Proteus mirabilis*).
		– Carboxy-pénicillines : ○ Carbénicilline ○ Ticarcilline	– *Pseudomonas aeruginosa.* – Les espèces de Proteus résistants à l'ampicilline. – Active contre Klebsiella, Serratia, Shigella, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgere*…etc. – Inactifs sur la majorité des souches de *Staphylococcus aureus*.
		Parentérale: ○ Acyl-amino-pénicillines (Uréido-pénicillines) : • Azlocilline • Mezlocilline • Pipéracilline	– Spectre large par apport aux Carboxyphenyl pénicillines. – Actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*, Klebsiella et quelques espèces Enterobacter. Moins efficaces sur *Escherichia coli*, Enterobacter et Salmonella.
	Amidino-pénicillines	– Mécillinam – Pivmécillinam	– Actifs uniquement sur les bacilles à Gram- – Pas d'action sur les Cocci à Gram+
	Pénicillines sulfones : inhibiteurs de β lactamases utilisées en association avec une β lactamine	– Ampicilline+Sulbactam – Pipéracilline +Tazobactam	– Bactéries à Gram- fermentaires – Bactéries à Gram- oxydatifs
Noyau clavame	Oxapénames ou clavams (acide clavulanique inhibiteurs de β lactamases utilisés en association avec une β lactamine)	– Amoxicilline+Acide clavulanique – Ticarcilline + Acide clavulanique	– Bactéries à Gram-fermentaires – Bactéries à Gram- oxydatifs

Noyau pénème	Carbapénèm-es	Parentérale : – Imipénème+ cilastatine – Méropénème – Ertapénème	– Bactéries à Gram⁻ y compris *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau II.2: Classification des Céphalosporines et monobactames (Lima, Nascimento, et al. 2020).

	DCI + voie d'administration	**Spectre d'activité**
Céphalosporines de 1ère génération	Parentérales : – Céfalotine – Céfapirine – céfazoline Orale : – Céfalexine – Céfadroxile	– Actifs sur les bactéries Gram⁺ et quelques bactéries Gram⁻ (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae et Proteus mirabilis).*
Céphalosporines de 2ème génération	Parentérales : – Céfuroxime – Céfprozile – Céfamondole Orale : – Céfaclore – Loracarbef – Céfprozile	– Plus efficaces sur les bacteries Gram⁻ – Céfuroxime est efficace sur une grande variété d'infection causées par des bactéries aérobies Gram⁺ ou Gram⁻. – Inactifs sur *Pseudomonas aeruginosa.*
Céphalosporines de 3ème génération	Parentérales : – Céfotaxime – Céftizoxime – Céftriaxone – Cefpirome – Céfoperazone	– Actifs sur *Pseudomonas aeruginosa.* – Actifs sur les bacilles entériques Gram⁻.
Céphalosporines de 4ème génération	Parentérales: – Céfepime – Céfpirome	– -Même spectre d'action sur les Gram⁻ et un spectre élevé sur les Gram⁺ par apport les céphalosporines de 3ème génération. – Actifs sur MMSA, *Streptococcus spp., P. aeruginosa.*
Céphalosporines de 5ème génération	Parentérales: – Céftaroline – Ceftobiprole	– Actifs sur les cocci Gram⁺ (MRSA, MSSA, *Streptococcus spp.*) – Inactifs sur *Acinetobacter baumanii et Stenotrophomonas maltophilia.*
Les monobactames		
Noyau	**DCI + voie d'administration**	**Spectre d'activité**
Monobactame	Aztreonam	– Spectre large sur les bactéries aerobies Gram⁻ (ex : *Pseudomonas aeruginosa*). – Inactifs sur les Gram⁺.

II.3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

II.3.2.1. Les aminoglycosides :

Les aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, d'origine naturelle ou semi synthétique, ceux qui portent le suffixe « mycine » sont dérivés du genre Streptomyces alors que les dérivés du genre Micromonospora portent le suffixe « micine ». sont utilisés pour le traitement des infections bactériennes tels que celles causées par des staphylocoques. Aujourd'hui les recherches sont focalisées sur la modification de leurs structures chimique pour réduire la toxicité et la résistance contre ces antibiotiques antibiotiques (Hu et al. 2021) (Germovsek, Barker, and Sharland 2017) (Jiang, Karasawa, and Steyger 2017).

Les aminoglycosides sont classés en trois catégories : les 2-déoxystreptamines disubstituées en 4,5 (4,5-DDS), les 2-déoxystreptamines disubstituées en 4,6 (4,6-DDS) et les aminoglycosides atypiques non substitués.Ces médicaments ciblent l'ARN 16S du ribosome au niveau du site A et inhibent la synthèse protéique en provoquant des erreurs de lecture ou en empêchant la traduction des protéines (Hu et al. 2021) (Bolard 2019).

II.3.2.2. Les chloramphenicols :

Isolés à partir de *Streptomyces venezuelae*, sont des antibiotiques à large spectre, bactériostatiques. Dans certains cas, ils présentent une activité bactéricide, notamment sur *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis.* Les CAM sont constituées d'un noyau *p-nitrobenzène* lié avec le radicale dichloroacetyl (Dinos et al. 2016) . Les CAM inhibent la synthèse protéique en empêchant la traduction, ils se lient avec l'ARNr 23s de la sous unité 50s du ribosome et empêchent la formation de la liaison peptidique ce qui conduit à l'arrêt de l'élongation de la chaîne peptidique, donc arrêt de synthèse protéique (Tevyashova 2021).

II.3.2.3. Les Tetracyclines :

Le premier antibiotique de la famille des tétracyclines a été extrait à partir de *Streptomyces aureofaciens* et a été nommé auréomycine. Les tétracyclines sont bien connues par un large spectre d'activité et une large gamme d'utilisation contre les infections bactériennes causées par des bactéries Gram négatives et Gram positives, des bactéries intracellulaires obligatoires et des parasites protozoaires (Rusu and Buta 2021).

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques (certaines études ont décrit leurs effets bactéricides in vitro, notamment dans le cas de tigécycline) qui agissent sur la synthèse protéique. Les tétracyclines se lient avec l'ARN ribosomal 16s de la sous-unité 30s du ribosome et empêchent la pénétration de l'aminoacyl-tRNA dans le site A du ribosome et par conséquent l'élongation de la chaine polypeptidique est arrêtée. Ainsi, la synthèse des protéines est arrêtée (Rusu and Buta 2021).

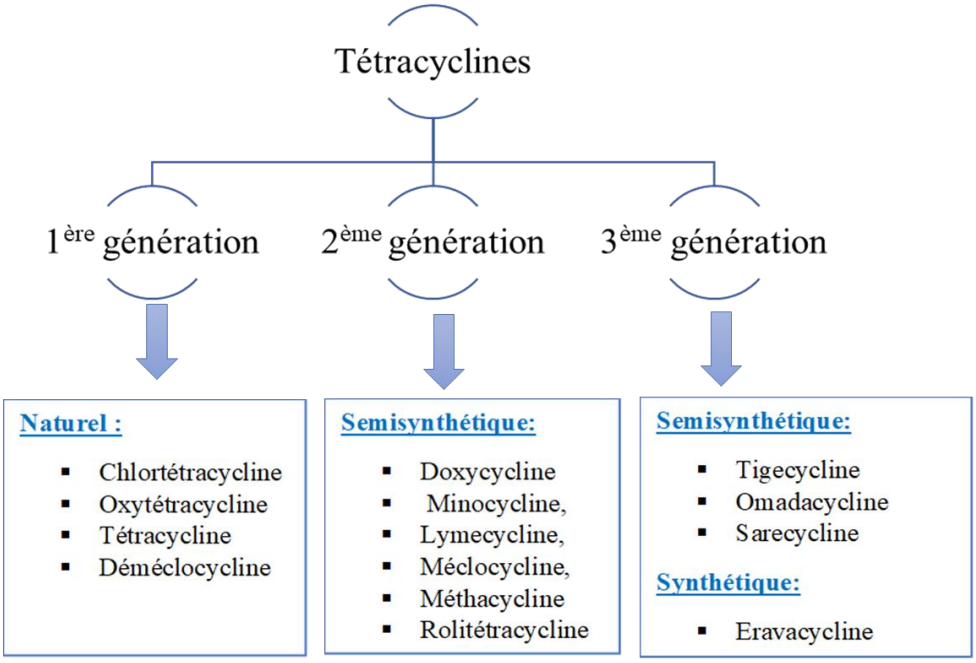


Figure II.1: Classification des tetracyclines (Rusu and Buta 2021).

II.3.3. Antibiotiques actifs sur les acides nucléiques

II.3.3.1. Les Quinolones :

Les quinolones sont des antibiotiques à large spectre, d'origine synthétique, comprennent quatre générations qui ont progressivement étendu le spectre antimicrobien et l'utilisation clinique. Une bonne distribution à travers les différents tissus et organes avec des effets indésirables réduits voir rares, rendent ces antibiotiques un bon choix pour le traitement des infections causées par des bactéries Gram positives et Gram négatives (Millanao et al. 2021) (Bush et al. 2020).

Les quinolones agissent sur les deux enzymes d'ADN bactérien gyrase et topoisomérase IV. Ainsi, en raison de la stabilisation du complexe enzyme-ADN, l'ADN est clivé. Selon la concentration de l'antibiotique, la mort de la bactérie survient en deux façons : Pour les faibles concentrations, les quinolones bloquent la réplication et la transcription de l'ADN et pour les

fortes concentrations (au-delà de la concentration minimale inhibitrice), lorsque l'ADN topoisomérase est dissocié/ retiré, les deux brins de l'ADN restent libres, ce qui conduit à la fragmentation du chromosome. En générale, l'ADN gyrase des bactéries Gram négatives est plus susceptible d'être inhibé que la topoisomérase IV, en revanche la topoisomérase IV des bactéries Gram positives est plus susceptible d'être inhibé que la gyrase (Rusu et al. 2021).

Les quinolones sont classées en quatre générations. La première génération comprend les non-fluoroquinolones telles que l'acide nalidixique, qui sont actives contre les bactéries gram-négatives mais inactives contre les pseudomonas. Les trois autres générations regroupent les fluoroquinolones, telles que la norfloxacine, appartenant à la deuxième génération, le lévofloxacine de la troisième génération et la moxifloxacine de la quatrième génération. Ces dernières possèdent une activité contre les Enterobacteriaceae (Rusu et al. 2021).

II.3.3.2. Triméthoprimes :

Les triméthoprimes sont des antibiotiques lipophiles d'origine synthétiques appartiennent à la famille des diaminopyrimidines, ils sont administrés en association avec les sulfonamides à fin d'avoir un effet synergique pour le traitement des infections bactériennes tels que les infections urinaires (Koutsoumanis et al. 2021). Ces antibiotiques ont un large spectre sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Enterobacterales*, Pasteurella spp., Staphylococcus spp., Streptococcus pneumoniae*.) et aussi sur plusieurs protozoaires tels que Toxoplasma et coccidies (Koutsoumanis et al. 2021).

Les triméthoprimes inhibent la synthèse de l'ADN par l'inhibition de dihydrofolate réductase qui réduit le dihydrofolate en tétrahydrofolate cela bloque la synthèse du folate qui est un cofacteur essentiel dans la biosynthèse de la thymidine et donc dans la synthèse de l'ADN et cela entraîne une inhibition de la croissance bactérienne (Koutsoumanis et al. 2021).

II.4. Résistance acquise :

La résistance acquise se réfère à des souches bactériennes qui à l'origine, étaient sensibles à un antibiotique spécifique mais qui ont acquis la capacité de résister à cet antibiotique (YALCOUYE 2020) . Cette résistance est le résultat de modifications génétiques causées par des mutations ou par l'acquisition de matériel génétique étranger à travers des processus tels que la conjugaison, la transduction ou la transformation. La résistance chromosomique résulte de mutations spontanées sur le chromosome de la bactérie, ce qui conduit à une résistance spécifique à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques. Cette résistance est peu fréquente et ne peut pas être transférée à d'autres bactéries. La résistance extra chromosomique se produit

lorsque les bactéries acquièrent de l'ADN étranger via des plasmides, des bactériophages ou des transposons. Cela implique un transfert horizontal des gènes de résistance, qui peut se produire par la conjugaison (échange de matériel génétique entre bactéries), la transduction (transfert de matériel génétique par des bactériophages) ou la transformation (Houda and Meriem 2019).

II.5. Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) :

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes produites par certaines bactéries qui ont la capacité d'hydrolyser les antibiotiques de la famille des bêtalactamines tels que la céfotaxime, la ceftriaxone, la ceftazidime et l'oxyiminomonobactam. En général, les BLSE sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Elles se trouvent principalement dans les bactéries Gram-négatives, notamment dans les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* (Ghafourian et al. 2014). Cependant, bien que les BLSE présentent des propriétés biochimiques communes en termes d'hydrolyse des antibiotiques bêta-lactames à spectre élargi et d'inhibition par l'acide clavulanique, les gènes codant pour ces enzymes sont divers et peuvent être regroupés en plusieurs familles. Certaines de ces familles, comme les BLSE de type TEM et SHV, présentent une forte similarité, avec des variants ne différant que par quelques substitutions d'acides aminés. D'autres familles, telles que les BLSE de type CTX-M, sont beaucoup plus génétiquement (Castanheir et al. 2021).

II.5.1. Les bêta-lactamases de type TEM :

Les BLSE de type TEM sont des variantes de la bêta-lactamase plasmidique originale, TEM-1, qui a été découverte dans les années 1960. La première dérivée de TEM, TEM-2, présente une seule substitution d'acide aminé, Gln39Lys, par rapport à TEM-1. Bien que ce changement n'ait pas altéré le profil des substrats de TEM-1, TEM-2 a été le précurseur de nombreuses BLSE de type TEM. La première variante de type TEM à présenter le phénotype BLSE était TEM-3, signalée en 1989. Jusqu'à présent, 243 variantes différentes de TEM ont été décrites, bien que toutes ne soient pas des BLSE. Les substitutions d'acides aminés dans l'enzyme TEM se produisent généralement à des positions spécifiques, et certaines nouvelles variantes présentent des changements subtils dans leur profil de substrats. Par exemple, TEM-184 capable d'hydrolyser plus efficacement l'aztréonam que la céftazidime ou la céfotaxime (Castanheira, Simner, Bradford, et al. 2021). Les enzymes de type TEM sont devenues actuellement plus rares tandis que les bêta-lactamases de type CTX-M sont les plus répandues dans le monde (Castanheira et al. 2021).

Biologie moléculaire

III/ Biologie moléculaire :

III.1. L'extraction de l'ADN :

L'extraction des acides nucléiques est une étape cruciale en biologie moléculaire pour obtenir des échantillons d'ADN purs en vue d'analyses ultérieures. Le processus d'extraction d'ADN comprend la rupture des membranes cellulaires et nucléaires, la séparation et la purification de l'ADN des autres composants du lysat cellulaire, ainsi que la concentration et la purification de l'ADN. Au fil du temps, différentes méthodes d'isolement d'ADN ont été développées, mais la méthode au phénol-chloroforme est considérée comme la méthode de référence (Dairawan and Preetha J 2020).

La technique de phénol-chloroforme repose sur l'utilisation d'un mélange réactif comprenant un tampon de lyse contenant du SDS (dodécylsulfate de sodium), du TE (tampon Tris-EDTA) et de la protéinase K. Ce tampon de lyse joue un rôle essentiel dans la dissolution des membranes cellulaires et de l'enveloppe nucléaire. En parallèle, le phénol, le chloroforme et l'alcool sont utilisés pour séparer l'ADN des autres composants cellulaires. Le phénol agit en dénaturant et en précipitant les protéines, tandis que le chloroforme, en augmentant la densité de la phase organique, empêche le phénol de passer dans la phase aqueuse. Par centrifugation, l'échantillon forme une émulsion biphasique, permettant la séparation des phases organique et aqueuse. L'ADN se trouve principalement dans la phase aqueuse, tandis que les protéines et les autres composants cellulaires se trouvent dans la phase organique. La méthode de phénol-chloroforme offre un rendement élevé en ADN et est relativement peu coûteuse. Cependant, elle présente certaines limitations importantes. La toxicité du phénol et du chloroforme nécessite l'utilisation d'une hotte aspirante pour assurer la sécurité des manipulateurs. De plus, les échantillons d'ADN extraits présentent une pureté supérieure à celle des autres méthodes conventionnelles. Malgré ces limitations, la technique de phénol-chloroforme reste largement utilisée en raison de son efficacité et de son coût abordable. Elle peut être appliquée à différents types d'échantillons tels que le sang, les cultures en suspension et les tissus homogénéisés, ce qui en fait une méthode polyvalente pour l'extraction d'ADN (Dairawan and Preetha J 2020).

III.2. La réaction de polymérisation en chaine (PCR) :

La PCR, développée par Mullis en 1983, est une technique enzymatique in vitro qui permet d'amplifier de manière spécifique et en grande quantité des courts fragments de séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN). Les produits de la PCR peuvent ensuite être analysés en les séparant par électrophorèse sur un gel, ce qui permet leur visualisation et leur identification (Bhanothu and Venkatesan 2019).

Le principe fondamental de la PCR repose sur la réplication in vitro répétée du matériel génétique cellulaire cible, où un fragment d'ADN peut être amplifié de manière exclusive à l'aide de l'enzyme ADN polymérase dans un processus semi-conservateur. Cette enzyme synthétise une séquence complémentaire d'ADN en utilisant une amorce spécifique attachée à l'un des brins d'ADN à des sites particuliers sélectionnés pour démarrer la synthèse. Les amorces permettent de cibler la séquence à amplifier et de produire des milliards de copies du fragment d'ADN souhaité (Bhanothu and Venkatesan 2019). Un cycle de PCR se compose généralement de trois étapes distinctes :

A. **Dénaturation :** L'échantillon d'ADN contenant la séquence cible est chauffé à une température élevée, généralement (≈95 °C). Cela permet de séparer les deux brins d'ADN, formant ainsi des brins simples (Ahrberg, Manz, and Chung 2016).

B. **Hybridation (ou annealing) :** la température est diminuée pour cette étape (≈56 °C) pour permettre aux amorces (petits fragments d'ADN complémentaires à la séquence cible) de se lier spécifiquement aux brins simples d'ADN (Ahrberg et al. 2016).

C. **Élongation :** Une enzyme appelée ADN polymérase qui est souvent dérivée d'organismes thermophiles comme *Thermus aquaticus* se fixe au complexe. L'ADN polymérase synthétise un nouvel brin d'ADN en ajoutant des nucléotides complémentaires à la séquence cible, en utilisant les amorces comme points de départ. Pour augmenter l'activité de la polymérase, la température est augmentée pour cette étape, typiquement à environ 72°C (Ahrberg et al. 2016).

Les trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) sont répétées plusieurs fois, pour amplifier la séquence d'ADN cible de manière exponentielle (Ahrberg et al. 2016).

III.2.1. Les composants du Mix PCR :

1.ADN matrice : Avant de procéder à la réaction de PCR, il est nécessaire d'extraire l'ADN à partir de l'échantillon que l'on souhaite analyser. Cette extraction permet d'isoler l'ADN de l'échantillon et de le purifier, de sorte que le fragment d'ADN cible soit présent dans un échantillon utilisable pour la PCR (DEBAB and MADASSE 2020).

2.ADN polymérase : Le rôle de l'ADN polymérase est de copier les nucléotides d'ADN. Lorsque l'enzyme se fixe à l'ADN simple brin, elle synthétise un nouveau brin d'ADN qui est complémentaire au brin d'origine. Toutefois, pour initier ce processus de synthèse, les ADN polymérases requièrent une courte région d'ADN double brin, connue sous le nom d'amorce (DEBAB and MADASSE 2020).

La Taq ADN polymérase obtenue à partir de *Thermus aquaticus* (Taq) est stable à des températures élevées et nécessite des amplifications spécifiques, tandis que d'autres ADN polymérases se dénaturent. De même, les ADN polymérases thermostables sont divisés en deux groupes : celles avec une activité d'exonucléase (correction des erreurs) de 3′ ⟶ 5′, telles que la Pyrococcus furiosus (Pfu) ADN polymérase, et celles sans fonctions de correction des erreurs, comme la Taq ADN polymérase. Les ADN polymérases de correction des erreurs sont plus précises que les ADN polymérases sans correction des erreurs en raison de leur activité d'exonucléase 3′ ⟶ 5′, qui peut éliminer les nucléotides mal incorporés d'une chaîne en formation d'un fragment d'ADN (Bhanothu and Venkatesan 2019).

3.Les amorces : à la fois sens et inverses, sont des courts oligonucléotides d'environ 17 à 30 paires de bases. Idéalement, elles doivent être parfaitement complémentaires à la séquence cible à analyser et avoir une composition globale de 50% de bases G et C. Il est important que ces amorces ne s'hybrident pas entre elles (formation de dimères d'amorces) ou avec elles-mêmes (auto-hybridation), ni ne forment de boucles (structures en épingle). La présence de dimères d'amorces parasites peut diminuer la sensibilité de la PCR (DEBAB and MADASSE 2020).

4.Les nucléotides dNTPs : Les nucléotides dNTPs (désoxyNucléotides-Triphosphates), tels que le dGTP, le dATP, le dCTP et le dTTP, sont assemblés par l'enzyme Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire (DEBAB and MADASSE 2020).

5.Le magnésium (Mg++) : est un cation essentiel dans la réaction de PCR car il agit comme un cofacteur nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme polymérase. Il joue un rôle crucial dans l'incorporation des précurseurs de nucléotides lors de la synthèse de l'ADN. Le magnésium est généralement ajouté sous forme de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) dans la réaction de PCR, et sa concentration doit être soigneusement optimisée pour assurer une amplification efficace et spécifique (DEBAB and MADASSE 2020).

Tous les composants mentionnés précédemment seront mélangés dans le même tube réactionnel (DEBAB and MADASSE 2020).

6.Le milieu réactionnel : Le milieu réactionnel de la PCR est composé de plusieurs éléments essentiels : l'ADN à amplifier, les dNTPs (désoxynucléotides-Triphosphates), les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium ($MgCl_2$). Ces deux derniers composants, sont particulièrement importants car ils déterminent le pH optimal et la concentration saline nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme Taq polymérase (DEBAB and MADASSE 2020).

III.3. Les gènes de virulence :

III.3.1. Gène *STX* :

Les gènes *Stx* sont les principaux facteurs de virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine (STEC), et parmi lesquelles *EHEC*. L'expression de ces gènes induit a la production de Shiga-toxine et servent de marqueurs moléculaires pour détecter et identifier ces agents pathogènes dans les aliments et les échantillons cliniques (Pakbin et al. 2020). Les gènes *stx* (*Stx1* et *Stx2*) sont portés par des bactériophages tempérés (phages Stx). Ces phages sont des virus à ADN double brin qui partagent une organisation génétique fonctionnelle similaire au phage lambda, un des phages d'*E. coli* les mieux étudiés. Cependant, il existe des variations importantes dans leur composition génétique et leur taille de génome, allant de 28,7 à 71,9 kb. Ilssont classés en différentes familles de l'ordre Caudovirales en fonction de leur structure morphologique. Par exemple, le phage stx2a 933W d'Escherichia coli O157:H7 appartient à la famille des Podoviridae (Rodríguez-Rubio et al. 2021).

Les phages Stx ont un système de régulation commun comprenant les gènes *cro, cI, N et Q*, qui sont impliqués dans la régulation du phage pour entrer soit dans le cycle lysogénique ou lytique. Les gènes stx sont situés entre le gène antiterminateur Q et la cassette de lyse (gènes S, R et Rz). Ils sont contrôlés par le promoteur pR' (Figure III.1) (Rodríguez-Rubio et al. 2021).

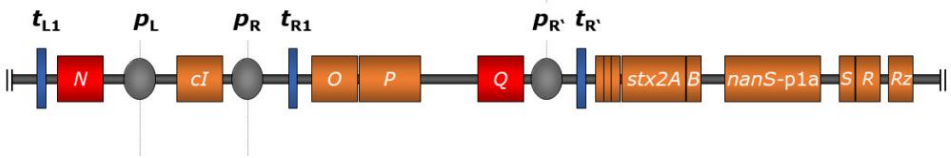


Figure III.1: la régulation de l'expression de gène stx2 chez le bacteriophage 933W de la souche O157: H7 EDL933 (Rodríguez-Rubio et al. 2021).

La diversité de la région génomique entre les gènes de l'antiterminateur Q et stx parmi les phages Stx du même sous-type peut influencer le niveau d'expression de Stx. Lorsqu'un phage entre en cycle lysogénique, son ADN s'insère dans le chromosome d'*Escherichia coli*, formant un prophage qui est transmis verticalement à la descendance bactérienne pendant plusieurs générations cellulaires. La réponse SOS bactérienne est activée en présence de conditions environnementales menaçant la viabilité de la cellule bactérienne, telles qu'un pH bas, la présence de fer, la présence (ou l'absence) d'ions ou d'autres agents endommageant l'ADN, ce qui induit l'induction du prophage (Rodríguez-Rubio et al. 2021).

Après induction, les prophages sont excisés du chromosome et l'ADN virale se réplique de façon indépendante du chromosome bactérien sous forme d'élément extrachromosomique. Il a été constaté que *stx* peut être détecté dans un état extrachromosomique circulaire lorsque les

éléments non chromosomiques sont analysés par Southern blot après une PFGE d'ADN digéré par S1 de souches STEC. Lors de la réplication, l'expression des protéines structurales des phages et du Stx a lieu. Les composants structurels sont assemblés en nouvelles particules de phage Stx, qui sont libérées de la cellule par l'action des protéines lytiques de phage exprimée à la fin du processus d'induction. Cela perturbe la cellule bactérienne hôte, permettant la libération et la propagation de la shigatoxine, principal facteur de virulence déterminant la gravité et la létalité de l'infection STEC. La Shiga-toxine peut être libérée par des vésicules de la membrane externe (OMV) pour se protéger de la dégradation par les protéases. Les phages *stx* sont également libérés, favorisant ainsi la dissémination et l'acquisition du gène stx par d'autres cellules sensibles, contribuant à l'évolution des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) (Rodríguez-Rubio et al. 2021).

Gène *Stx1* :

Le gène *stx1* code pour la toxine Stx 1 (Shiga-toxine1) qui possède 99% d'identité avec la toxine Stx de *Shigella dysenteriae*, de ce fait, Shiga-toxine1 est neutralisable par les anticorps Anti-Stx de *Shigella dysenteriae*. Ce gène est décomposé en 3 variants (*stx1*^{a}, *stx1*^{c} *et stx1*^{d}) (Bonanno 2016). Son expression est assurée par deux promoteurs indépendants : un promoteur de phage tardif (ρR') dépendant de l'induction phagique et permettant la libération de la toxine par les phages médiés à la lyse cellulaire cellulaire (Rodríguez-Rubio et al. 2021), et un promoteur intrinsèque (ρ_{stx1}) et une séquence de liaison du régulateur d'absorption ferrique (Fur). En présence de faibles concentrations de fer, la production de Shiga-toxine1 est stimulée mais la lyse cellulaire n'est pas induite, conduisant à une accumulation de la toxine dans les cellules (Yano et al. 2023).

Gène *Stx2 :*

Le gène stx2 est principalement porté par un bactériophage de la famille des *Podoviridae*, bien que quelques rapports mentionnent sa présence dans des phages de la famille des *Myoviridae* (Rodríguez-Rubio et al. 2021). Il code pour la toxine Stx2 (Shiga-toxine2), qui possède 56% d'identité avec la toxine Stx de Shigella dysenteriae et donc il n'est pas neutralisable par les anticorps Anti-Stx de Shigella dysenteriae. Ce gène est décomposé en sept variants (*stx2*^{a}, *stx2*^{b}, *stx2*^{c}, *stx2*^{d}, *stx2*^{e}, *stx2*^{f} *et stx2*^{g}) (Bonanno 2016). Il possède son propre promoteur fonctionnel. Cependant, un promoteur plus puissant, équivalant au promoteur tardif du génome du phage λ. Le promoteur $P_{R'}$ joue un rôle prépondérant dans la transcription à haut niveau de la toxine Stx2 (Figure III.1) (Koitabashi et al. 2006).

III.3.1.2. Les Shiga-toxines :

Les Shiga-toxines sont considérées comme le principal facteur de virulence des STEC. Elles sont codées par les gènes *stx* présents au sein du génome des bactériophages Stx (ou phages Stx) (Bonanno 2016).

Les Shiga-toxines, parmi les toxines bactériennes les plus puissantes, sont codées par un groupe de gènes appelés stx (Pakbin et al. 2020) portés sur un opéron de 1230 pb. Ces toxines appartiennent à la famille des toxines de type AB5 et sont constituées d'une sous-unité A codée par le gène stxa et de cinq sous-unités B codées par le gène stxb La sous-unité A, composée d'une sous-unité A1 contenant le site actif et d'un peptide A2 relié au pentamère de sous-unités B, endommage le ribosome des cellules cibles et inhibe la synthèse des protéines (Bonanno 2016) (Melton-celsa 2014). Le pentamère de sous-unités B (7,7 kDa par monomère) constitue le domaine de liaison aux cellules endothéliales humaines (Bonanno 2016) en se liant au récepteur cellulaire le globotriaosylcéramide Gb3 (Melton-celsa 2014), situés sur les cellules endothéliales. Une fois internalisées par endocytose, les toxines subissent un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. La partie A de la toxine est ensuite activée et pénètre dans le cytoplasme, où elle exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S, entraînant l'arrêt de la synthèse protéique et la mort cellulaire. Les effets cytotoxiques et apoptotiques des toxines Stx ont été observés sur différents types cellulaires, tandis que les sous-unités B pourraient induire la production de cytokines par les cellules épithéliales intestinales (Bouvier 2011).

III.3.2. Gène *eae* :

Le gène *eae* est considéré comme le principal facteur de virulence majeur (BOUVIER 2011), situé dans l'îlot de pathogénicité *LEE*, d'une longueur d'environ 2 800 pb. Il existe au moins 19 groupes de sous-types de gène *eae*, à savoir *α, β, γ, ε, ξ, z, η, θ, τ, ι, κ, λ, μ, ν, υ, ο, π, ρ et σ* , qui codent pour l'intimine, une protéine de 94 kDa impliquée dans la formation des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) (Hua et al. 2020) (BOUVIER 2011). Le N-terminal de l'intimine est hautement conservé, tandis que le C-terminal, responsable de l'activité de liaison cellulaire, présente une grande variabilité. Sur la base de cette différence, au moins 30 sous-types d'intimine ont été définis à savoir α1, α2, α8, β1, β2, β3, γ1, γ2, ε1, ε2, ε3, ε4, ξ, z, z3, η, η2, θ, τ, ι1, ι2, κ, λ, μ, ν, υ, ο, π, ρ et σ (Yang et al. 2020). Il a été suggéré que les allèles d'intimine sont responsables de la spécificité de l'hôte et du tropisme tissulaire (Hua et al. 2020). Plusieurs études ont montré l'association entre les sérotypes et des sous-types spécifiques

d'intimines, par exemple, les sérotypes O157:H7 et O145:H28 sont associés au sous-type eae-γ1, tandis que O26:H11 est souvent porteur du sous-type eae-β1, O103:H2 et O121:H19 du sous-type eae-ε, et O111:H8 du sous-type eae-θ1 (Yang et al. 2020).

III.3.2.1. Locus d'effacement de l'entérocyte (*LEE*) :

LEE où le gène *eae* est porté est d'une taille de 35,5 kb composé de 41 gènes différents (Figure III.2) organisés en trois régions majeures :

1. Système de sécrétion de type III (TTSS) codé par un groupe de gène (*sepA* à *sepI*) qui exporte les molécules effectrices de virulence en les injectant dans la cellule hôte (PATON 2008) (Michèle 2016).
2. Une région d'adhésion qui est l'intimine codée par le gène *eae* et son récepteur de translocation Tir :

- Gène *eae* : code pour l'intimin, une protéine de membrane externe (OMP) de 939 amino-acides qui assure la fixation intime à l'entérocyte (PATON 2008).
- Gène *tir* : code pour le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor) qui a été auparavant appelée Hp90, une protéine de 78 kDa injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce au système de sécrétion de type III où il est modifié par des kinases. Tir s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte (PATON 2008) (BOUVIER 2011).

3. Plusieurs protéines sécrétées (Esp) codées par les gènes esp. Les protéines sécrétées sont impliquées dans la modification du signal de transduction au niveau de la cellule hôte lors de la formation des lésions A/E. Les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de sécrétion de type III (BOUVIER 2011) (Michèle 2016).

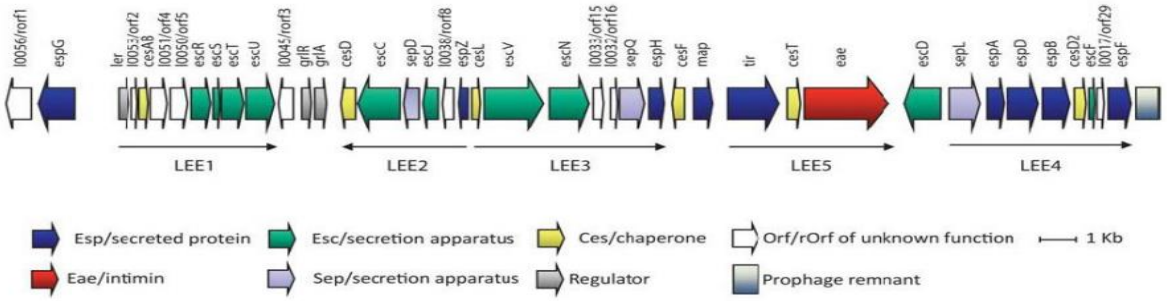


Figure III.2: Structure du LEE d'E. coli O157:H7.

III.3.3. Gène *cnf1* :

Le gène cnf1 est un gène trouvé dans certaines souches de la bactérie E.coli (Travaglione, Fabbri, and Fiorentini 2008) et code pour une toxine appelée "Cytotoxic Necrotizing Factor 1" (CNF1) (Tsoumtsa Meda et al. 2022). Ce gène est localisé sur le chromosome de la bactérie (Alhadidi, Al-Qaysi, and Al-Halbosiy 2022), et il est principalement retrouvé dans des souches pathogènes d'*E. coli*, notamment celles impliquées dans des infections intestinales ou extra-intestinales telles que les infections des voies urinaires, la bactériémie et la méningite chez les nouveau-nés (Fabbri and Bracci 2022). Ce gène est d'une taille de 3042 bp (Soltani et al. 2018) et est codé au sein du même îlot de pathogénicité d'une hémolysine (HlyA) (Fabbri and Bracci 2022), il est étroitement associé à un opéron hlyCABD à travers une séquence intergénique (igs) de 943 pb comprise entre les gènes *hlyD* et cnf1 (Landraud et al. 2003). CNF1 et HlyA sont toujours Co-transcrits sous le même régulateur coopérant pour favoriser la persistance des bactéries pathogènes au cours de la bactériémie (Fabbri and Bracci 2022).

III.3.3.1. Le facteur I de nécrose cytotoxique (Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF1):

CNF1 est un facteur de virulence bactérien (Wang and Kim 2013). Il a été décrit pour la première fois en 1983 par Caprioli et ses collaborateurs comme une toxine capable de provoquer une multi-nucléation "Cytotoxic" dans des cellules en culture et une nécrose de la peau de lapin "Necrotizing". C'est une toxine protéique bactérienne à chaîne unique de 115 kDa qui exerce un contrôle très spécifique de l'activité Rho GTPase (Tantillo et al. 2018) (Alhadidi et al. 2022) entraînant des altérations du cytosquelette et certains effets sur le cycle cellulaire avec une macropinocytose, induisant un effet spécifique (CPE) connu sous le nom de mégalocytose, provoquant la multi-nucléation et l'agrandissement de la cellule (Alhadidi et al. 2022). Il est composé de trois domaines le domaine N-terminal, le domaine de translocation et le domaine C-terminal, indispensables à son activité catalytique (Tantillo et al. 2018).

III.3.3.2. Mode d'action :

Le CNF1 se lie à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules hôtes et est internalisé par endocytose pour être libérée dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, le CNF1 active spécifiquement les protéines Rho GTPases, Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la régulation de la dynamique du cytosquelette et dans divers processus cellulaires. Le CNF1 modifie chimiquement les Rho GTPases en catalysant leur désamination, c'est-à-dire la conversion de l'acide glutamine en glutamate. Cette modification altère l'activité des Rho GTPases. en activant et modifiant les Rho GTPases, le CNF1 provoque des altérations du

cytosquelette cellulaire, cela peut entraîner des changements morphologiques, tels que des altérations de la structure et de la fonction des filaments d'actine (Fabbri and Bracci 2022).

III.3.4. Gène *afa* :

Les gènes *afa* codent pour les adhésines afimbriales (Afas) exprimées par la souche d'*Escherichia coli* associée à la diarrhée (Servin 2005). Ces protéines d'adhésion facilitent l'attachement des *E. coli* pathogènes aux tissus de l'hôte (Julie-Hélène 2014).

Ils sont codés par un groupe de cinq gènes, à savoir *afaC, afaB, afaD, afaE* et *afaA*, d'une longueur totale de 6,7 kb, parmi eux, *afaB, afaC* et *afaE* sont responsables de l'expression de l'adhésine et de son attachement aux cellules épithéliales (FigureIII.3). *AfaB* est la principale protéine structurale, tandis que *AfaC* est le précurseur de la protéine MRHA (hémagglutination résistante au mannose), qui permet l'agglutination des érythrocytes sans être inhibée par la présence de D-mannose mais elle dépend de la présence de la protéine AFA-I (Aleksandrowicz et al. 2021). Le gène *afaE* présente une grande hétérogénéité, conduisant à la production d'adhésines ayant des antigènes distincts (Le Bouguénec and Servin 2006).

Il existe quatre opérons différents (*afa-1, afa-2, afa-3 et afa-4*) qui codent pour les adhésines Afa-I, Afa-II, Afa-III et Afa-IV respectivement (Aleksandrowicz et al. 2021). L'analyse des gènes afa-3 a révélé que les opérons de la famille afa se composent de six gènes (afaA à afaF) organisés en deux unités transcriptionnelles distinctes. La première unité comprend les gènes afaA à afaE, tandis que la deuxième unité comprend le gène afaF (Le Bouguénec and Servin 2006).

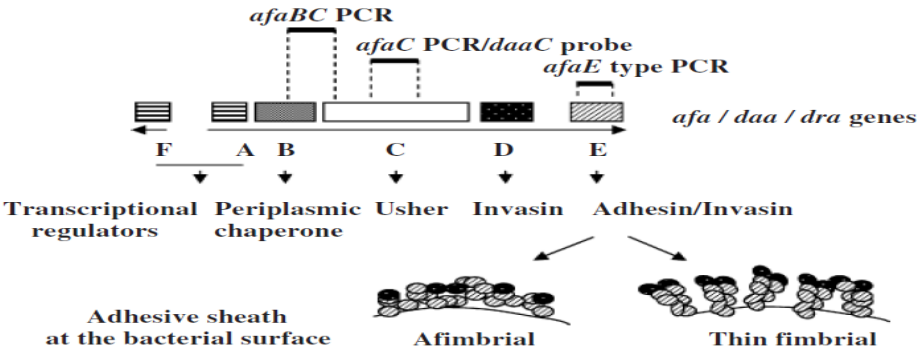


Figure III.3: Organisation génétique et structurelle des groupes de gènes afa (Le Bouguénec and Servin 2006)

III.3.5. Gène *ompT* :

Le gène *ompT* est présent chez près de 90% d'*E.coli* uropathogène cliniquement isolées, est largement exprimé parmi les gènes de virulence impliqués dans les infections urinaires.

OmpT, une protéine de la membrane externe, a été identifiée comme un facteur de virulence majeur chez la plupart des *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC). Elle appartient à la famille des protéases omptine présentes dans certaines bactéries Gram-négative. OmpT est une protéase aspartique localisée sur la membrane externe d'*Escherichia coli* (He et al. 2015). Bien qu'il n'y ait pas de substrats naturels rapportés pour OmpT, les observations de son activité sur les protéines recombinantes suggèrent son implication potentielle dans la maturation des protéines sécrétées. Cependant, il n'est pas clair si OmpT peut faciliter une infection bactérienne en jouant un rôle similaire dans la dégradation des peptides ou des protéines antimicrobiennes dérivées de l'hôte lors des interactions pathogènes entre *Escherichia coli* et les cellules épithéliales urinaires (Hui et al. 2010). *OmpT* joue un rôle multifactoriel dans la pathogenèse des infections urinaires, notamment en augmentant l'adhérence et l'invasion bactériennes, en favorisant la formation de bactéries intracellulaires communautaires (IBCs) et en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires (He et al. 2015).

III.4. Les gènes de résistance aux antibiotiques :

III.4.1. Gène *tet(A)*:

Plus de quarante gènes acquis sont responsables de la résistance à la tétracycline, en utilisant divers mécanismes pour neutraliser l'effet de l'antibiotique. Le gène de résistance à la tétracycline a d'abord été identifié par sa capacité à conférer une résistance à *E. coli*. Ces gènes codent pour des pompes à efflux, une inactivation enzymatique ou des gènes de protection ribosomique (Perewari et al 2022).

La résistance aux tétracyclines est principalement médiée par la protéine TetA, qui est intégrée dans la membrane cytoplasmique des bactéries. Cette protéine est codée par le gène *tet(A)* et sa régulation se fait généralement au niveau de la transcription par le répresseur TetR, qui est sensible aux tétracyclines et est codé par le gène *tet(R).* En l'absence de l'antibiotique tétracycline, le répresseur se lie aux séquences tetO1 et tetO2, ce qui entraîne l'arrêt de la transcription des gènes *tet(A)* et *tet(R)*. Une fois que la tétracycline pénètre dans la cellule, elle se lie au répresseur avec une forte affinité. Cela induit un changement de sa conformation et entraîne sa dissociation de tetO, permettant ainsi l'expression du gène *tet(A)*(Hillen and Berens 1994). La protéine TetA doit être exprimée avant que la concentration intracytoplasmique de tétracycline n'atteigne un niveau suffisant pour inhiber la traduction. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une forte affinité de TetR pour tetO et tétracycline afin de maintenir un faible niveau d'expression basal de *tet(A)*, ainsi qu'une expression élevée et à court terme de TetA pour réduire initialement la concentration interne de tétracycline (Hillen and Berens 1994).

III.4.2. Gène *TEM* :

Le gène TEM est responsable de la production d'une enzyme appelée bêta-lactamase de type TEM, qui confère une résistance aux bêta-lactamines. Ces enzymes ont été initialement isolées en 1965 à partir d'une souche d'E. coli provenant d'un patient nommé Temoneira, à Athènes, en Grèce, d'où leur nom TEM (Ur Rahman et al. 2018).

Les bêta-lactamases TEM appartiennent à la classe A des bêta-lactamases et sont capables d'hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines de première génération, telles que la céphaloridine. Elles sont fortement inhibées par l'acide clavulanique et les tazobactams. Selon un rapport publié en 2005, 138 types de bêta-lactamases TEM ont été décrits, souvent médiés par des plasmides. Ces variantes sont dérivées de mutations dans les gènes TEM classiques (TEM-1 et TEM-2), qui impliquent des substitutions d'un ou plusieurs acides aminés autour du site actif (Ur Rahman et al. 2018).

III.4.2.1. Mode d'action des β-lactamases :

Les β-lactamases de classe A utilisent des résidus d'acides aminés spécifiques dans leur site actif pour faciliter la liaison, la formation d'acyl-enzyme et la libération du l'antibiotique. Certains résidus clés, tels que Ser70, Ser130, Asn132, Glu166, Asn170, jouent un rôle crucial dans ces processus. Par exemple, Ser70 agit comme un "agent nucléophile" en attaquant le groupement carbonyle de l'anneau β-lactame des β-lactamines, tandis que Glu166 agit en tant que base générale en activant une molécule d'eau qui participe à la réaction. Des interactions entre certains acides aminés comme Asn170 et Glu166, aident à positionner les résidus pour faciliter la réaction (Palzkill 2018).

Ces résidus essentiels sont nécessaires pour la catalyse de tous les types d'antibiotiques β-lactamines. Des mutations affectant ces positions réduisent l'activité catalytique. Cependant, des mutations sur d'autres résidus, en particulier ceux situés dans une structure appelée boucle oméga, peuvent augmenter l'efficacité de l'enzyme pour hydrolyser certains types spécifiques d'antibiotiques β-lactamines, tels que les oxyimino-céphalosporines (Palzkill 2018).

III.4.3. Gène *qnr* :

Bien que la résistance aux quinolones soit généralement le résultat de mutations chromosomiques (Wang, Sahm, et al. 2006) par deux principaux mécanismes, soit par modification des cibles des quinolones par des substitutions d'acides aminés dans les régions déterminantes de résistance aux quinolones de l'ADN gyrase (gyrA et gyrB) et des sous-unités de l'ADN topoisomérase IV (parC et parE), ce qui entraîne une modification de la cible (Pakzad

et al. 2011)(Rezazadeh, Baghchesaraei, and Peymani 2016), soit par une diminution de la concentration intracellulaire due à l'imperméabilité de la membrane ou à la surexpression des systèmes de pompe à efflux(Pakzad et al. 2011), des études récentes indiquent que la résistance aux quinolones peut également être médiée par des plasmides(Wang, Tran, et al. 2006). Les gènes (*qnr*) médiatisent la résistance aux quinolones à médiation plasmidique en codant pour des protéines appartenant à la famille des répétitions pentapeptidiques, qui protègent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV contre les composés quinolones (Rezazadeh et al. 2016). Ce gène est porté par les intégrons de classe 1 de la famille In4 (Jeong et al. 2005).

Environ 100 variants de gènes *qnr* ont été décrits principalement chez les Enterobacteriaceae, et regroupés en 5 familles distinctes : *qnrA, qnrB, qnrC, qnrD* et *qnrS* (Salah, Fortune Djimabi, Soubeiga et al. 2019). Les trois principaux groupes de déterminants qnr sont qnrA, qnrB et qnrS. Le premier gène de résistance aux quinolones à médiation plasmidique (*qnrA*) a été identifié dans une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* isolée en Alabama en 1998. Les deux autres déterminants de *qnr* (*qnrB et qnrS*) ont par la suite été observés chez d'autres espèces d'entérobactéries dont *E. coli, Enterobacter spp., Salmonella spp.* et *Klebsiella pneumoniae* (Rezazadeh et al. 2016).

QnrA confère une résistance aux quinolones telles que l'acide nalidixique et augmente les CMI des fluoroquinolones jusqu'à 32 fois dans *Escherichia coli*. De plus, il favorise la sélection de déterminants de résistance aux quinolones codés par les chromosomes qui confèrent une résistance supplémentaire aux fluoroquinolones. Les déterminants de la résistance, QnrB (QnrB1 à QnrB6) et QnrS (QnrS1 et QnrS2) partageant respectivement 41 % et 60 % d'identité d'acides aminés avec QnrA (Pakzad et al. 2011).

III.4.4. Gène *dfrA1* :

Le gène dfrA1 code pour une dihydrofolate réductase (DHFR) qui présente une résistance élevée au triméthoprime, conférant une augmentation de la résistance de 1000 fois chez *E. coli*. Il est le plus répandu parmi les gènes *dfr* extrachromosomiques, présent dans 38 % des souches porteuses de ces gènes, et est souvent associé à des intégrons de type I et II (Lombardo et al. 2016).

Epidémiologie

IV/ Epidémiologie

IV.1. Epidémiologie

Les Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC) sont d'importants pathogènes d'origine alimentaire ayant un réservoir bovin. Pendant plusieurs années, la recherche et la réglementation ont porté sur le sérogroupe EHEC le plus souvent associé à une maladie humaine grave, l'EHEC O157 (Liesel J. Schneider 2017) responsable des diarrhées , des colites hémorragiques (HC) et du syndrome hémolytique urémique(SHU) (Barka and Mebrouk 2014).

Selon (Lemaignen et al. 2013) , environ 73 000 infections à *E. coli* O157 :H7 surviennent chaque année aux États-Unis, entraînant 2170 hospitalisations et 61 décès.

La diarrhée sanglante représente le symptôme initial d'une infection potentielle à EHEC. Des études ont montré que la prévalence des EHEC était d'environ 1 % à partir de coprocultures effectuées pour des diarrhées de toutes sortes, et de 3.5 % pour les diarrhées sanglantes. Le sérotype O157 est le plus courant, représentant environ 50 % des cas. Chez les patients atteints d'une infection à *E. coli* non O157, un épisode de diarrhée sanglante est retrouvé chez 53 % à 77 % des patients, tandis que pour les *E. coli* du sérogroupe O157 ce taux est de 67 % à 91 %. 4 à 9 % des cas sporadiques de diarrhées a EHEC se compliquent de SHU qui est considéré comme la complication la plus sévère d'infection par EHEC, allant jusqu'à 20 % dans les formes épidémiques (Lemaignen et al. 2013). Le SHU est en effet la principale cause d'insuffisance rénale aigue chez l'enfant de moins de 3 ans. La létalité varie de 3 à 5 % et plus d'un tiers des malades conservent des séquelles rénales à long terme (Brugère et al. 2012).

Le taux d'incidence global du syndrome hémolytique et urémique (SHU) est estimé à deux cas pour 100 000 patients-années, mais il atteint un pic chez les patients de moins de cinq ans avec un taux de 6.1 cas pour 100 000 patients-années, représentant environ la moitié des cas de SHU post-diarrhéique. Entre 35 et 60 % des patients nécessitent une transfusion de culots globulaires, tandis que 50 à 60 % ont besoin d'une dialyse pendant la phase aiguë de la maladie, et 12 % nécessitent une épuration extra-rénale chronique. En conséquence, le SHU post-infectieux est la principale cause de dialyse chez les enfants aux États-Unis (Lemaignen et al. 2013).

IV.1.1. Europe :

Selon (Brugère et al. 2012) et d'après les données épidémiologiques mondiales, un grand nombre de sérotypes d'EHEC (plus de 200) sont liés à des symptômes cliniques graves chez l'être humain, tels que la colite hémorragique ou le SHU. Bien que le sérotype O157:H7 soit le

plus fréquent (64 % des cas de SHU en Europe entre 2002 et 2006), seuls quelques sérotypes ont été régulièrement impliqués dans des épidémies. La figure IV.1 montre quelques épidémies d'EHEC en Europe survenues entre 2006 et 2011.



Figure IV.1: Épidémies à EHEC survenues depuis 2006 en Europe et publiées dans la littérature internationale (Brugère et al. 2012).

IV.2. Les gènes de virulence :

IV.2.1. Gènes Stx1[a] et stx2[a] :

IV.2.1.1. Europe :

L'étude réalisée sur 272 souches (isolées entre janvier 1996 et septembre 2012 a partir des selles de patients atteints de SHU, de diarrhée sanglante ou de diarrhée non sanglante) d'*Escherichia coli* entérohémorragique O26 dans 7 pays européens (Allemagne, Autriche, Italie, la République tchèque, Belgique, Le Royaume-Uni, Slovaquie) a montrées que 107 des souches (39.3%) possèdent le gène *stx1[a]* (Bielaszewska et al. 2013).

a. Espagne :

Une étude menée en Espagne entre 1980 et 1999 a examiné 171 souches de STEC O157 provenant de différentes régions géographiques d'Espagne. Ces souches ont été isolées à partir de diverses sources y compris 171 isolats (82 isolats bovins, 67 isolats humain, 12 isolats ovins, 10 isolats de produits de bœuf cru). Les souches ont été analysées par la méthode PCR, révélant que 3 (2%) des souches contenaient des gènes stx1, 104 (61%) possédaient des gènes stx2, et 64 (37%) possédaient à la fois les gènes stx1 et stx2, alors que le gène *eae[c]* était absent dans toutes les souches (0%) (Tableau IV.1) (Mora et al. 2004).

Une étude menée en Espagne a examiné 13 souches d'EHEC (O157 H :7, O26 H :11 , O103 H:2) isolées à partir de viande de bœuf hachée collectée dans 30 magasins locaux de la ville Lugo entre 1995 et 2003 à partir un total de 785 échantillons. Les souches ont été analysées par la méthode PCR, et les résultats ont montré que 11 souches présentaient le gène *stx1* et 7 possédaient le gène *stx2* tandis que 5 avaient les deux gènes à la fois (Tableau IV.1) (Mora, Blanco, et al. 2007) .

Un total de 514 isolats de STEC provenant de bovins diarrhéiques et sains en Espagne a été caractérisés dans cette étude. Parmi eux, 111 étaient des E. coli entérohémorragiques de différents sérotypes (O26:H11, O103:H2, O157:H7). Les souches d'EHEC ont été examinées par PCR multiplex pour détecter la présence des gènes de virulence *stx1* et *stx2*. Les résultats ont montré que 65 (58,56 %) des souches possédaient le gène *stx1*, 80 (72,07 %) possédaient le gène *stx2* et 34 (30,63 %) possédaient les deux gènes simultanément (Tableau IV.1) (M. Blanco et al. 2004).

Une étude menée en Espagne entre 1992–1999 à portée sur 141 souches (soit 20%) d'*E.coli* O157 :H7 isolées à partir d'un échantillonnage total de 722 isolats d'*E.coli* productrice de Shiga toxines STEC. Parmi ces souches, 47 provenaient d'isolats humains, 82 provenaient d'isolats bovins, 7 provenaient de viande de bœuf et 5 provenaient d'isolats ovins. Les souches ont été analysées par la méthode de la PCR et les résultats ont montré que 3 (2%) souches présentaient le gènes *stx1*, 82 *(*58%*)* possédaient des gènes *stx2*, et 56 *(*40%*)* possédaient à la fois les gènes *stx1* et *stx2* (Tableau IV.1) (Mora et al. 2004).

b. Italie :

Une étude réalisée en Italie, entre décembre 2001 et janvier 2003 a examiné 88 souches d'*E. coli* O157 :H7 isolées à partir de 12 (27%) des 45 veaux examinés. Les souches d'EHEC ont été examinées par PCR multiplex pour détecter la présence des gènes de virulence *stx1* et *stx2*. Les résultats ont montré que 48 souches (soit 54.5%) portaient le gène *stx2*, 37 souches (soit 42.04%) ne présentaient aucun des deux gènes et trois souches (soit 3.4%) possédaient à la fois *stx1* et *stx2* (Tableau IV.1) (Alonso et al. 2007).

c. Turquie :

Une étude menée dans l'est de la Turquie (Malatya et Elazig) a porté sur 10 souches d'*E.coli* O157 isolées à partir des selles de patients souffrant de diarrhée, sur un total de 367 échantillons. Les souches ont été testées par PCR multiplex, et les résultats ont révélé que aucune de ces

souches (0%) ne possédait les gènes *stx1* et *stx2* (Tableau IV.1) (Kalin, Ongor, and Cetinkaya 2012).

La réaction de PCR multiplex réalisée par (Kalin et al. 2012) sur 5 souches d'*E.coli* O157 isolées à partir des échantillons d'organes internes (foie et caecum) de poulets de chair sélectionnés au hasard (n = 1 000) d'un âge moyen de 43 jours prélevés chaque semaine dans trois abattoirs des provinces de Malatya et d'Elazig, situés dans l'est de la Turquie entre septembre 2009 et avril 2010 , a révélé l'absence des gènes *stx1* et *stx2* dans ces souches (0%) (Tableau IV.1) (Kalin et al. 2012).

80 échantillons de viande hachée ont été prélevés chez des bouchers, des restaurants et des restaurants de viande grillée dans la province d'Elazig (Turquie) entre décembre 2009 et novembre 2010, dans le but d'isoler E. coli O157 et d'étudier la présence de gènes de Shiga toxine (*stx1* et *stx2*) par PCR. Sur ces 80 échantillons, seulement 6 (7,5 %) ont été identifiés comme étant des *E. coli* O157 :H7. Le gène *stx1* a été détecté dans un seul isolat et *stx2* dans trois des isolats. Un isolat présentait à la fois *stx1* et *stx2*, tandis que trois des isolats ne présentaient aucun des deux gènes (Tableau IV.1) (Kalin and Öngör 2014).

IV.2.1.2. Afrique :

a. Algérie :

Un total de 756 échantillons de viande bovine congelée importée de différentes pays (Uruguay, Brésil, Argentine, Irlande, Australie et Nouvelle-Zélande) ont été analysés afin de détecter la présence d'*E. coli* O157 :H7 et d'identifier les gènes de virulence *stx1* et *stx2* par PCR. Les résultats ont montré que seules cinq souches étaient identifiées comme étant des EHEC O157 :H7, soit un taux de prévalence de 0,66 %. Parmi ces 5 souches, une seule possédait le gène *stx1* tandis que toutes les souches possédaient le gène *stx2*. De plus, une seule souche avait les deux gènes simultanément et 4 souches possédaient le gène eae^{c} (Tableau IV.1) (Salih et al. 2014).

b. Nigeria :

Une étude menée à Ado-Ekiti au Nigeria entre janvier 2010 et décembre 2011 a examiné 13 souches (soit 4,1 %) d'*E. coli* O157 isolées à partir de bétails et 8 souches (soit 2,5 %) à partir de poulets locaux, à partir d'un échantillonnage total de 722 échantillons fécaux provenant de diverses sources. les souches ont été analysées par la méthode de la PCR et les résultats ont montrés que 13 souches (soit 61,9%) d'*E. coli* O157 isolées à partir des bétails présentaient le

gène *stx1* alors que le gène *eae*^{c} était absent (0 %) (Tableau IV.1) (Oluyege and Famurewa 2015).

IV.2.1.3. Amérique :

a. Pérou :

Une étude menée à Lima Métropolitaine (Pérou) entre octobre 2000 et février 2001 a examiné 50 (12.3%) souches d'EHEC isolées à partir 407 échantillons alimentaires dont (23 à partir 102 bœuf hachés, 15 à partir 102 viandes de bœuf , 8 à partir 102 fromages à pâte molle et 4 à partir 101 légumes frais). parmi les 50 souches, 35 souches ont été analysées par la méthode de la PCR au niveau de Laboratoire de Référence de *E.coli* (LREC) et les résultats ont montré que 33 souches ont les gènes *stx* dont 28 (80%) possédaient le gène *stx2*, 5 souches (14%) isolées à partir du fromage ont les deux gènes simultanément et aucune de ces souches (0%) ne possédait les gènes *eae*^{c} (Tableau IV.1) (Mora et al. 2007).

b. Argentine :

Une étude menée en Argentine en 2004 a examiné 14 souches d'EHEC O157 H:7, O26 H:11, O103 H:2 à partir des selles de bovins diarrhéiques et sains (131) et de produits de viande bovine (hamburgers et viande hachée) (22) à partir d'un total de 153 souches productrices des Shiga toxines . les souches ont été analysées par PCR révélant que 7 souches possédaient le gène *stx1* tandis qu'il est absent chez les7 autres souches et que 8 souches présentaient le gène *stx2* tandis qu'une seul souches avait les deux gènes à la fois (Tableau IV.1) (Miguel Blanco et al. 2004).

IV.2.1.4. Asie :

a. Japan :

Une étude réalisée dans la région de Kanto-Koshinetsu au Japon entre mai et octobre 1998 a examiné 16 souches d'EHEC à partir de 358 échantillons de selles prélevés sur des bovins laitiers (87 veaux de moins de 5 mois, 88 génisses de 5 à 12 mois et 183 vaches) dans 78 fermes. Les souches ont été analysées par PCR, et les résultats ont révélé que 2 souches (12,5 %) présentaient le gène *stx2* (Tableau IV.1) (Kobayashi et al. 2003).

b. Iran :

Une étude menée en Iran entre août 2010 et mai 2011 a examiné quatre souches d'*E. coli* O157 isolées à partir d'un total de 201 échantillons. Parmi ces échantillons, une souche provenait de 37 (soit 2,7%) de bœuf haché, deux souches provenaient de 50 (soit 4,0%)

échantillons de beurre traditionnel, et une souche provenait de 50 (soit 2,0%) échantillons de crème traditionnelle. Les souches ont été analysées à l'aide de la méthode de la PCR, et les résultats ont révélé que toutes les souches d'*E. coli O157* présentaient le gène *eae*^{c} (Tableau IV.1) (E. Rahimi 2012).

Tableau IV.1: Epidémiologie des gènes stx1, stx2 et eae^{c} en différents pays.

Pays	Année	Source de prélèvement	Type de prélèvement	Nombre d'EHEC	Gène				Référence
					stx1	*Stx2*	*Stx1* et *stx2*	*eae*	
EUROPE									
ESPAGNE	1980-1999	Humains Bovins ovins	/	171	3/171(2%)	104/171 (61%)	64/171 (37%)	0%	(Mora et al. 2004)
	1995-2003		Viande de bœuf hachée	13/785	11/13 (84.61%)	7/13 (53.84%)	5/13 (38.46%)	/	(Mora, Blanco, et al. 2007)
	2003	Bovins diarrhéiques et sains	/	111/514	65/111 (58,56 %)	80/111 (72,07 %)	34/111 (30,63 %)	/	(M. Blanco et al. 2004)
	1992-1999	Humains	/	47	0%	28 (60%)	19 (40%)	/	(Mora et al. 2004)
		Bovins		82	2 (2%)	46 (56%)	34 (41%)	/	
		Viande de bœuf		7	1 (14%)	3 (43%)	3 (43%)	/	
		Ovins		5	0%	5(100%)	0%	/	
		Totale		141/722	3 (2%)	82 (58%)	56 (40%)	/	
Italie	décembre 2001 et janvier 2003	Veaux	/	88	3/88 (3.4%)	48/88(54.5%)	3/88 (3.4%)	/	(Alonso et al. 2007)
Est de la Turquie	Septembre 2009 - avril 2010	Poulets de chair	Foie	1/1000 (0.1 %)	(0%)	(0%)	(0%)	/	(Kalin et al. 2012)
			Caecum	4/1000 (0.4 %)	(0%)	(0%)	(0%)		
			Totale	5/1000 (0.5%)	(0%)	(0%)	(0%)		
		Homme	selles	10/367 (2.7 %)	(0%)	(0%)	(0%)		
	décembre 2009 - novembre 2010,	/	viande hachée	6/80(7,5 %)	1/6	3/6	1/6	/	(Kalin and Öngör 2014)
Afrique									

Algérie	2014		viande bovine congelée	5/756 (0,66 %)	1/5	5/5	1/5	4 (80%)	(Salih et al. 2014)
Nigeria	janvier 2010-décembre 2011	Bétails poulets locaux	Selles	13/722 (4,1 %) 8/722 (2,5 %)	13/21 (61,9%) 0/21(0%)	0/21(0%) 0/21(0%)	0/21(0%) 0/21(0%)	0%	(Oluyege and Famurewa 2015)
Amérique									
Pérou	octobre 2000-février 2001	Bovin Fromage Légumes	Viande Fromage à pâte molle Légumes frais	50/407 (12.3%) 35/50 (70%) ont été analysées par PCR	5/35 (14%)	28 /35 (80%)	5/35 (14%)	0%	(Mora, León, et al. 2007)
Argentine	2004	Bovins	Viande	14/153 (9.15%)	7/14 (50%)	8/14 (57.14 %)	1/14 (7.14%)	/	(Miguel Blanco et al. 2004)
Asie									
Japan	Mai - octobre 1998	Bovins	Selles	16/358 (4.47%)	/	2/16 (12,5 %)	/	/	(Kobayashi et al. 2003)
Iran	Août 2010 - Mai 2011	/	/	4/201	/	/	/	100%	(Rahimi et al. 2012)

IV.2.2. Les gènes *cnf1* et *afa* :

IV.2.2.1. Asie :

a. Iran :

Un total de 18 isolats d'*E. coli* O157 ont été isolées à partir d'échantillons de viande de différentes sources collectées de manière aléatoire dans diverses régions de la province d'Ispahan, en Iran. Les échantillons comprenaient de la viande bovine (n = 40), ovine (n = 20), de chamelle (n = 30), de poulet (n = 60) et de dinde (n = 30). Les 18 souches ont ensuite été soumises à une analyse par PCR afin de détecter la présence des gène de virulence *cnf1* et *afa* et les résultats ont révélé que 61,6 % des souches isolées à partir des différents types d'échantillons présentaient le gène *cnf1* et *afa* (Mandana Lotfi, Hassan Momtaz 2021).

Sur les 110 échantillons d'urine prélevés à partir des patients présentant des symptômes d'infection urinaire à Sanandaj, à l'ouest de l'Iran, entre juillet et septembre 2015, 7 souches (6,4 %) ont été identifiées comme étant des *E.coli* entérohémorragiques (EHEC). Ces 7 souches

d'EHEC ont été analysées par PCR, et les résultats de l'étude indiquent que seulement 2 souches possèdent les gènes de virulence *cnf1* et *afa* (Derakhshan et al. 2019).

IV.3. Gène Ipr2 :

IV.3.1.1. Europe :

a. Allemagne :

6 souches d'EHEC isolées provenant de divers source et pays (2 a partir des humain (Brazil et Allemagne), 1 de bétail (Allemagne), 1 chameau(Allemagne), 2 veau(Suisse, Allemagne)) ont été analysées par PCR multiplexe , les résultats révèlent que seule la souches provenant de veau en suisse possède le gène ipr2 (Ewers et al. 2005).

IV.4. Les gènes de résistance aux antibiotiques :

IV.4.1. TEM :

IV.4.1.1. Afrique :

a. Egypt :

Une étude réalisée à Mansoura, en Égypte, en octobre 2015, a examiné 4 souches d'EHEC (28,5%) parmi les 14 souches d'*E.coli* isolés à partir de 120 échantillons de viande de poulet congelée. Les souches ont été analysées par PCR multiplex, et les résultats ont montré qu'une seule souche d'EHEC portait le gène *TEM* (Younis et al. 2017).

Un total de 150 échantillons de différents types, comprenant du lait cru, du fromage Kareish, de l'eau, de l'alimentation, des écouvillons de pis et des écouvillons rectaux, ont été isolés à partir de 25 buffles laitiers domestiques élevés dans différentes localités du gouvernorat de Dakahlia en Égypte entre décembre 2020 et juillet 2021 afin de caractériser la population bactérienne et le gène de résistance *TEM* par la méthode de la PCR multiplex. Les résultats ont révélé que parmi les 28 souches d'*E. coli* identifiées, 11 souches ont été identifiées comme étant des EHEC soit 39,28% et toutes les souches d'EHEC identifiées (100%) présentaient le gène de résistance *TEM* (Elafify et al. 2022).

Une étude menée en Égypte en 2022 a examiné 9 souches d'EHEC (30%) parmi les 30 souches d'*E. coli* isolées à partir du lait de vaches et de buffles atteints de mammite, de viandes bovines, de viandes de buffles et de viandes de poulet. Les souches ont été soumises à une analyse par PCR multiplex afin de détecter le gène de résistance *TEM*. Les résultats ont révélé que 2 souches étaient porteuses du gène *TEM* (Ashmony et al. 2022).

IV.4.1.2. Asie :

a. Jordanie :

Une étude menée au nord de Jordanie entre avril 2014 et juin 2015 a examiné 57 souches d'EHEC isolées à partir 407 échantillon fécal dont 100 échantillons à partir de l'homme et 307 animaux. Les souches ont été analysées par la PCR multiplex pour caractériser le gène *TEM*. les résultats ont révélé que 19 isolats (33.33%) présentent le gène de résistance *TEM* (Tarazi et al. 2021).

IV.4.2. CmlA, qnr, dfrA1, tet(A) :

Plusieurs études ont été menées dans différents pays, notamment en Iran et en Égypte, à différentes périodes, dans le but d'identifier les souches d'EHEC et de caractériser les différents gènes de résistance (*CmlA, qnr, dfrA1* et *tet(A)*), par la technique de PCR. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau IV.2 ci-dessous :

Tableau IV.1: Epidémiologie des gènes cmlA, tet(A), dfrA1, qnr dans differents pays.

Asie									
Pays	**Année**	**Source**	**Nombre et type de prélèvement**	**Nombre d'EHEC**	**Les gènes de résistance**				**Référence**
					CmlA	*Tet(A)*	*DfrA1*	*Qnr*	
Iran	2010-2011	35 Anesses 98 Brebis 110 Vache 52 Bufflonnes 85 chèvres	424 lait cru 295 produits laitiers	14/102 (13.72%)	4/14 28.57%	7/14 50%	12/14 85.71%	14 100%	(Momtaz, Farzan, et al. 2012)
	2010-2011	Poulets	422 échantillons de viande	31/146 37.80%	14/31 45.16%	14/31 45.16%	17/31 54.38%	18/31 58.06%	(Momtaz and Jamshidi 2012)
	2011-2012	Vaches atteintes de mammite	268 échantillons de lait cru	11/73 15.06%	2/11 18.2%	6/11 54.5%	5/11 45.5%	6/11 54.5%	(Momtaz et al. 2012)
	2015	70 vaches 68 moutons 60 chèvres 60 chameaux 80 poulets 60 dindes 60 cailles	458 échantillons de viande	36/458 7.86%	1/36 2.7%	22/36 61.11%	11/36 30.55%	15/36 41.66%	(Mashak 2018)

	2018		200 Hamburgers	19/200 9.50%	1/19 5.26%	11/19 57.89%	12/19 63.15%	10/19 52.63%	(Karimpour et al. 2019)
Egypte	2019		100 échantillons de lait	1/100	/	1/1 100%	/	/	(Younis, Hassan, and Mohamed 2021)

Matériels et méthodes

V/ Matériels et méthodes

V.1. Problématique et objectif :

Les infections à *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) sont une préoccupation majeure de santé publique en raison de la gravité des symptômes cliniques qu'elles peuvent provoquer. Cette étude vise à réaliser une caractérisation moléculaire des souches d'EHEC en détectant la présence des gènes de résistance aux antibiotiques, ce qui constitue un défi pour leur traitement, ainsi que les gènes de virulence impliqués dans leur pouvoir pathogène.

V.2. Type et période d'étude :

Il s'agissait d'une étude exhaustive menée du 1er février au 18 mai 2023, au cours de laquelle la collecte des souches a été réalisée entre le 4 décembre 2022 et le 8 mars 2023.

V.3. Cadre d'étude :

Cette étude vise à réaliser la caractérisation moléculaire des souches d'*E. coli* entérohémorragique afin de rechercher les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. Les souches ont été isolées et identifiées par les méthodes biochimiques au laboratoire d'analyses Zitouni, Chiffa et EPSP à Médéa, à partir d'échantillons d'urine.

V.4. Critères d'inclusion :

Les patients inclus dans cette étude ont été diagnostiqués positivement par une infection due à *E. coli* entérohémorragique, tous les groupes d'âge ont été inclus ainsi que les 2 genres.

V.5. Matériels et méthodes :

V.5.1. Les souches étudiées :

Cette étude a été effectuée sur les 20 souches identifiées en tant que *Escherichia coli* entérohémorragiques. Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Yahia Farès à Médéa).

V.5.2. Repiquage sur milieu MacConkey sorbitol (SMAC) :

Afin d'identifier le pathovare EHEC, 190 souches d'*Escherichia coli* ont été repiquées sur le milieu MacConkey sorbitol par ensemencement en stries serrées et incubées dans l'étuve pendant 24h à 37°C.

Après 24h la lecture des résultats a été réalisée, les colonies incolores avec un virage de couleur du milieu vers le jaune sont sorbitol négatif et donc la souche ensemencée s'agit d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) (FigureV.1), tandis que les colonies roses sans virage de couleur du milieu sont sorbitol positif et donc ne sont pas entérohémorragique (FigureV.1). Parmi les 190 souches d'*E. coli* ensemencées, 3 souches ont été sorbitol négatif (EHEC) (les autres 17 souches EHEC analysées dans cette étude ont été conservées préalablement).

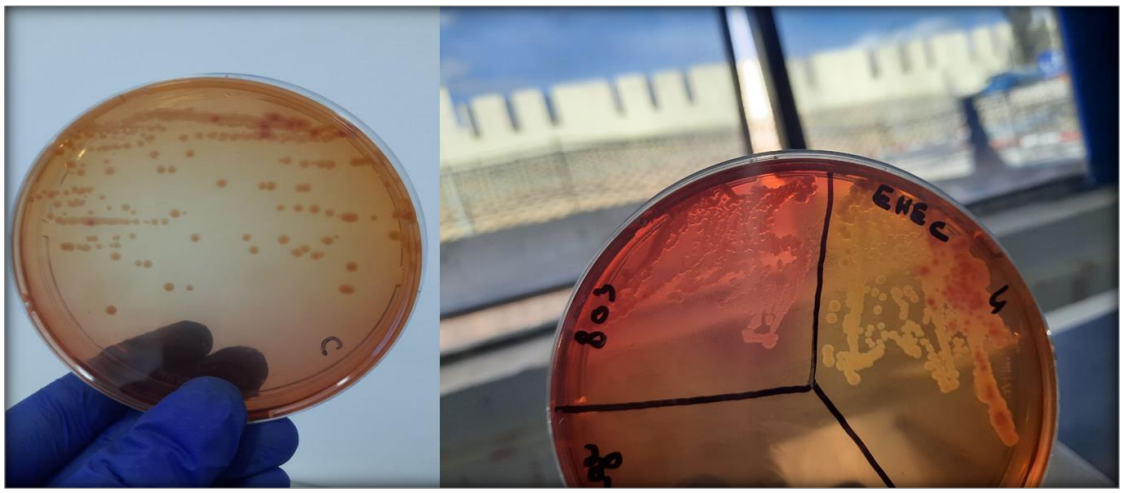


Figure V.1: colonies d'EHEC sur milieu MacConkey (milieu jaune et colonies incolores ou beiges (EHEC) et (milieu rose a rougeâtre et colonies rose (*E. coli* non entérohémorragique) (photo originale 2023).

V.5.3. Conservation des souches :

Les souches d'EHEC ont été conservés dans un milieu de conservation préalablement préparé (dans un Eppendorf de 1,5 ml mettre 0,5 ml de glycérol avec 0,5 ml de milieu BHIB).

Deux à trois colonies bien isolées ont été mis dans l'Eppendorf et elles ont été mélangées avec un vortex jusqu'à l'homogénéisation complète et conservées à -20°C.

V.5.4. Enrichissement :

L'enrichissement des souches a été effectué 48 heures avant le jour d'extraction d'ADN bactérien dans le milieu BHIB.

Quelques gouttes ont été introduites à l'aide d'une anse de platine à partir de la culture conservée préalablement dans un tube à essai contenant 5ml du milieu BHIB et ont été mélangées à l'aide d'un vortex puis incubés dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

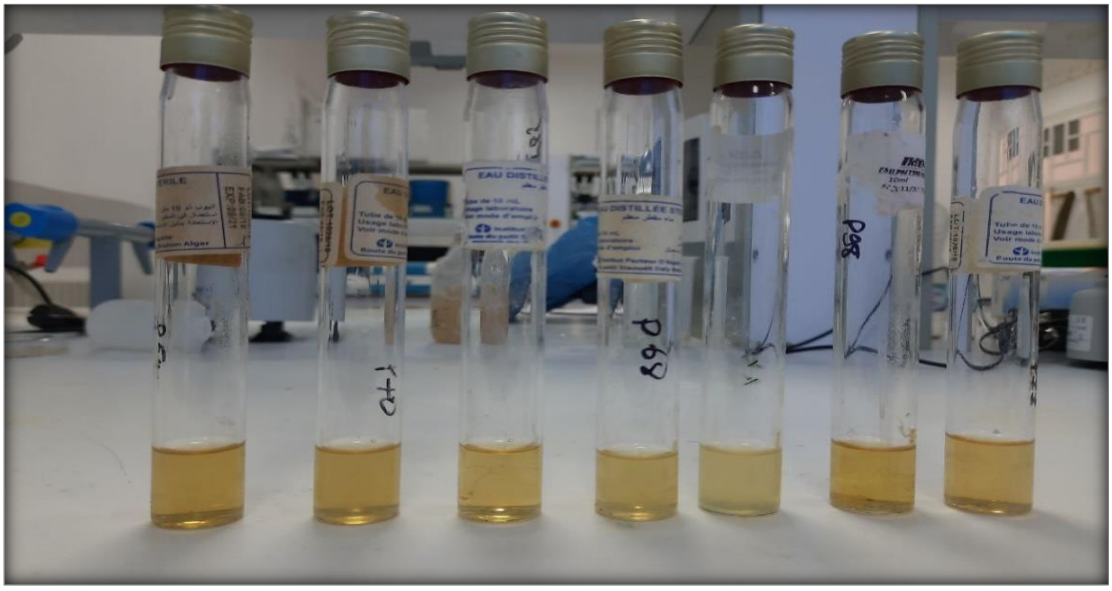


Figure V.2: Enrichissement des souches d'EHEC dans le milieu BHIB (photo originale 2023).

V.5.5. Ensemencement sur milieu Hektoen :

La suspension bactérienne obtenue à partir des milieux d'enrichissement a été ensemencée sur le milieu Hektoen à l'aide d'une anse de platine, puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Pour les souches qui n'ont pas montré de croissance sur le milieu Hektoen, le milieu GN a été utilisé comme alternative.

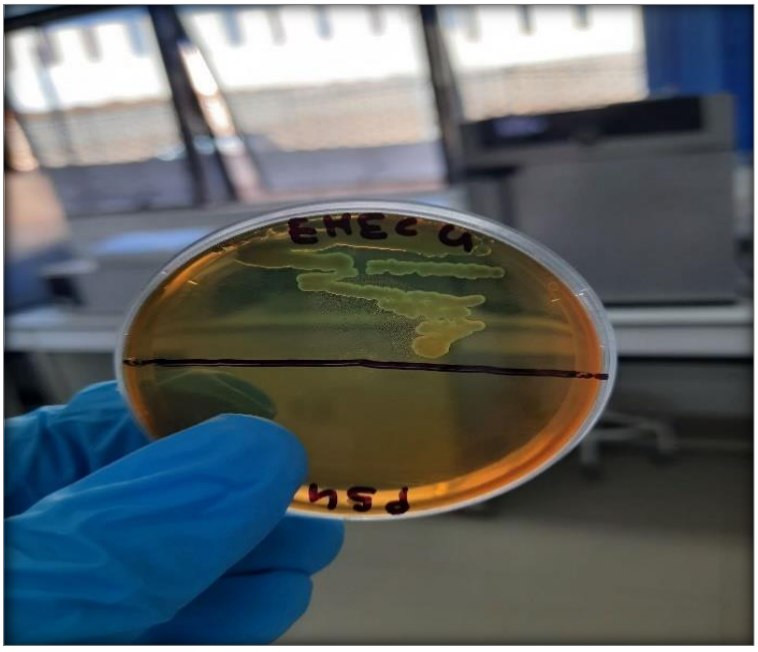


Figure V.3: Repiquage des souches sur milieu Hektoen (Photo originale 2023).

V.5.6. Biologie moléculaire :

V.5.6.1. Extraction d'ADN :

a. Préparations des milieux pour l'extraction d'ADN :

- Milieu LB (Luria-Bertani):

Pour un seul échantillon, 0.017 g de NaCl, 0.0075 g d'extrait de levure et 0.015 g de tryptone ont été dissous dans 1.5 ml d'eau distillé, ensuite, ils ont été mélangés à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à l'ébullition. Pour assurer la stérilité de la préparation, celle-ci a été soumise à un cycle d'autoclave de 20 minutes (MacWilliams and Liao 2016).

Tableau V.1: Préparation pour 1L du milieu LB.

Pour un litre de milieu LB	
Composant	Grammage
NaCl	11.7 g
Extrait de levure	7.5 g
Tryptone	15 g
Eau distillé	1 L



Figure V.4: Préparation du milieu LB (Luria-Bertani) (photo originale 2023).

- Lysis buffer (tampon de lyse) :

Cette préparation a été réalisé sous une hotte chimique. Pour 100 ml de lysis buffer , 93.4 ml de TE buffer a été introduite dans un flacon avec 6 ml de SDS10% et 600 µl de protéinase K (20 mg ml-1)(He 2011).

- SDS 10% (pour 100ml):

Sous une hotte spécifique, une quantité de 10 g de la poudre SDS a été ajouté dans un flacon contenant 80ml d'eau distillé (soyez prudent lorsque vous peser la SDS pour éviter l'inhalation parce que c'est une poudre fine) et mélangée par un agitateur magnétique à 60°C jusqu'à l'homogénéisation (ne mélanger pas trop vite car la solution bouillonnera trop), ensuite, la solution a été complétée à 100 ml en utilisant l'eau distillé. La solution n'a pas été autoclavée (Anon 2023).

Tableau V.2: composants pour SDS 10%.

Réactif	Masse /volume	Concentration finale
SDS	10g	10%
Eau distillé	Jusqu'à 100ml	

- EDTA (PH=8):

Afin de préparer 100 ml d'EDTA à une concentration de 0,5 M et un pH de 8, 18.61 g de sel disodique EDTA ont été placés dans un flacon de 100 ml et 80 ml d'eau distillée ont été ajoutés. Ensuite la préparation a été placé sur un agitateur magnétique (le sel EDTA ne se dissoudra pas avant d'atteindre le pH 8). Des pastilles d'hydroxyde de sodium NaOH ont été ajoutées à la solution pour dissoudre le sel, en ajoutant quelques pastilles à la fois et en attendant qu'elles soient complètement dissoutes avant d'en ajouter d'autres (l'évolution de PH a été suivie par un PH mètre). Une fois complètement dissous, la solution a été complétée à 100 ml en ajoutant l'eau distillé. Pour la stérilisation, la préparation a été soumise à un cycle d'autoclave de 20 minutes (Anon 2023).

Tableau V.3: composants pour la preparation d'EDTA.

Réactifs	Masse / volume	Concentration finale
EDTA sel disodique dihydraté	18.61 g	0.5 M
Eau distillé	80 ml	

- *Tris*-Cl :

Dans un flacon de 100 ml, une quantité de 12,11 g de Tris a été introduite, suivie de l'ajout de 80 ml d'eau distillée. La préparation a été placée sur un agitateur magnétique, puis une solution concentrée d'acide chlorhydrique a été ajoutée lentement à l'aide d'une pipette pasteur pour réduire le pH à 8. Le pH a été surveillé en temps réel à l'aide d'un pH-mètre, en veillant à ne pas ajouter trop d'acide en une seule fois, car cela pourrait entraîner une baisse rapide du pH. Une fois que le pH atteint 8, la solution a été complétée avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 100 ml. Pour assurer la stérilité de la préparation, celle-ci a été soumise à un cycle d'autoclave de 20 minutes (Anon 2023).



Figure V.1: Préparation de Tris-Cl (photo originale 2023).

Tableau V.4: composants pour la préparation de Tris-Cl.

Réactifs	Masse / volume	Concentration finale
Tris-base	12.11g	1M
Eau distillé	Jusqu'à 100ml	

- Phénol:

Pour la préparation du phénol, il est essentiel de prendre des précautions en portant un masque de protection respiratoire et des gants.

Sous une hotte chimique, un bécher contenant 100 ml d'eau distillée a été placé sur un agitateur magnétique. Des cristaux de phénol ont été ajoutés soigneusement jusqu'à saturation de la solution. Ensuite, la solution a été transférée dans un flacon hermétiquement fermé et laissée à reposer pendant une heure jusqu'à ce que le phénol se liquéfie et que les phases se

séparent (Figure V.6). Le surnageant a été éliminé, et le résidu a été conservé à température ambiante.



Figure V.6: phénol (photo originale 2023).

- TE buffer (PH=8) (tampon Tris-EDTA) :

Pour 100ml de TE buffer, 1 ml de 1M Tris-Cl (PH=8) a été mis dans un flacon en verre avec 0.2 ml de 0.5M EDTA (PH=8), ensuite, 98.8 ml d'eau distillé ont été ajouté et la préparation a été mélangée en inversant le flacon. Pour la stérilisation, le tampon a été passé dans l'autoclave pendant 20 min et conservé à température ambiante (Anon 2023).

Tableau V.5: composants pour la préparation du TE buffer (tampon Tris-EDTA).

Réactifs	Volume	Concentration finale
1M Tris-Cl (PH=8)	1 ml	10 mM
0.5M EDTA (PH=8)	0.2 ml	1 mM
Eau distillé	98.8 ml	

b. Protocole d'Extraction d'ADN :

Toutes les étapes d'extraction d'ADN ont été effectuées sous une hotte microbiologique décontaminée préalablement par les radiations ultra-violet (UV) pendant 20 minutes. L'extraction d'ADN a été réalisée selon le protocole des Etats unies détaillé par (He 2011) (modifié).

Trois colonies isolées à partir de la culture sur milieu Hektoen à l'aide d'une anse de platine stérile ont été suspendu dans un tube incurvé de 2 ml contenant 1.5 ml de milieu LB, bien mélangées par un vortex, puis les tubes ont été incubés dans un bain-marie sec pendant une nuit à 37°C (Figure V.7/A).

Après une nuit d'incubation, les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes à 12 000 tours /min. Le culot (Figure V.7.B) a été récupéré et remet en suspension avec 600 µl de Lysis Buffer puis mélangé par un vortex. Les tubes ont été incubés dans le bain marie sec à 37 °C pendant

une heure. Un volume de 600 µl du phénol/chloroforme (1 :1) a été ajouté aux tubes après l'incubation et les phases ont été bien mélangées en inversant le tube (le vortex n'était pas utilisé afin de ne pas endommager l'ADN.), par la suite, les tubes ont été centrifugés pendant 8 min à 12 000 tours /min.

Après centrifugation, l'apparition d'une couche protéique blanche dans l'interface phénol/chloroforme (FigureV.7.C). Un volume de 1 ml de la phase aqueuse supérieure a été transféré soigneusement dans un nouveau tube à l'aide d'une micropipette sans toucher la couche blanche. Pour éliminer le phénol, un volume de 600 µl de chloroforme a été ajouté et mélangé en inversant le tube, les tubes ont été centrifugés à 12 000 tours /min pendant 8 min, ensuite la couche aqueuse (FigureV.7.D) a été transférer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml et un volume de 2.5 à 3 d'Éthanol absolu conservé préalablement à -20°C a été ajouté afin de précipiter l'ADN, par la suite, les tubes ont été incubés à -20°C pendant 1h 30min, après ils ont été centrifugés à 12 000 tours /min à 4°C pendant 18 minutes. Le culot d'ADN a été rincé avec 1ml d'éthanol 70% et centrifugé pendant 5 minutes a 12 000 tours /min, le surnageant a été éliminé soigneusement et l'ADN a été séché dans le bain-marie sec à 37°C et il a été remet en suspension avec 350 µl de TE buffer (tampon Tris-EDTA). La suspension finale a été conservée à -20°C.



Figure V.7: les étapes d'extraction d'AND (photo originale 2023).

Schéma récapitulative : organigramme de démarche de l'extraction d'ADN :



1

1.5 ml de milieu LB + 3 colonies EHEC incubés dans un bain marrie sec pendant une nuit à 37°C.

2

Centrifuger pendant 5 min à 12 000 tours /min

3

Jeter le maximum de surnageant sans détruire le culot

4

Rendre en suspension le culot avec 600µl de lysis buffer et mélanger par un vortex.

5

Incuber les tubes dans un bain marrie sec pendant 1h à 37°C.

6

Ajouter 600 µl phénol/chloroforme (1:1) et mélanger en inversant le tube jusqu'à homogénéisation.

NB : N'utiliser pas le vortex afin de ne pas endommager l'ADN

7

Centrifuger à température ambiante pendant 8min a 12 000 tours /min.

NB : Toutes les rotations sont réalisées à température ambiante sauf indication contraire

8

Apparition d'une couche aqueuse blanche a l'interface phénol/chloroforme

9

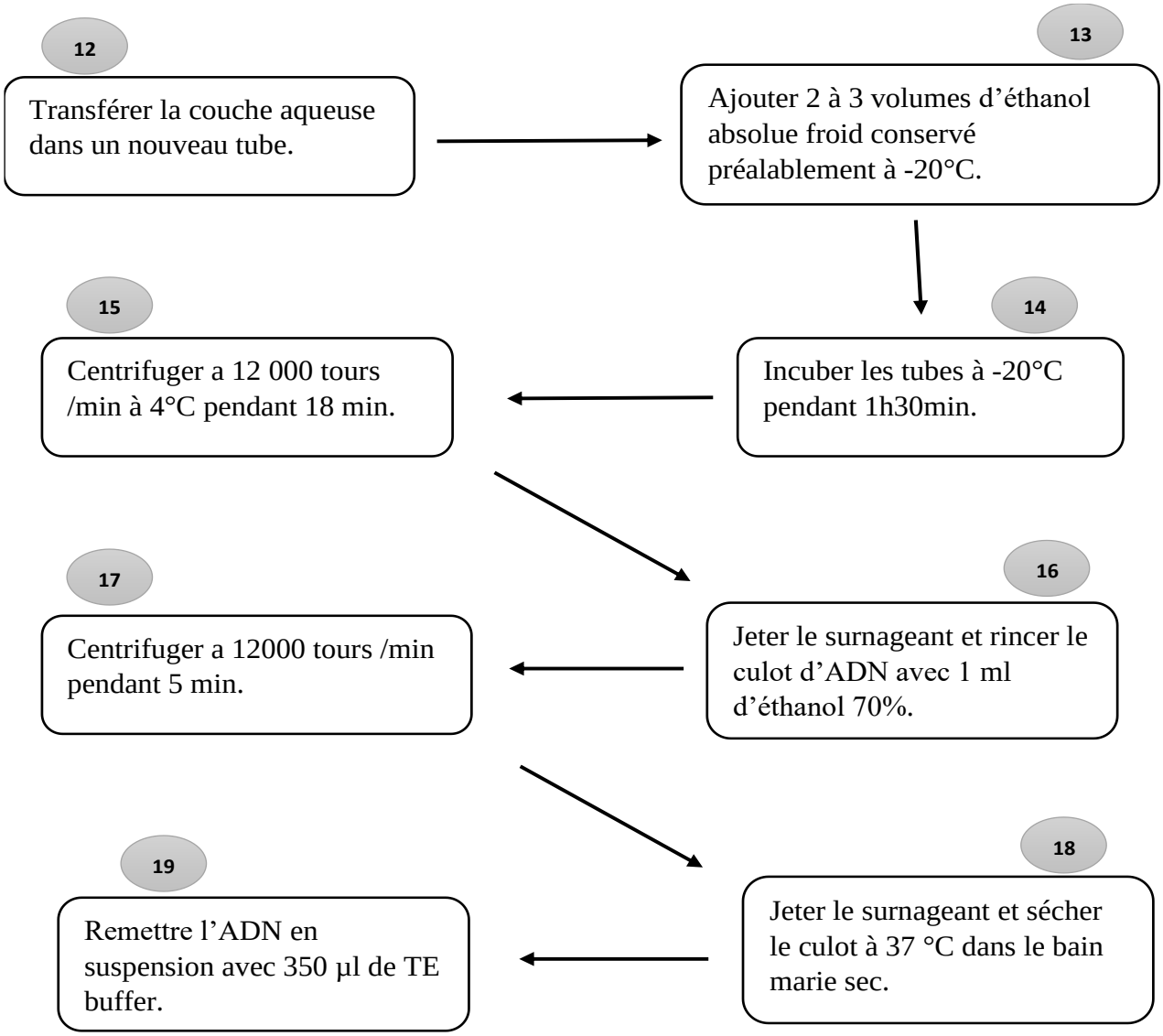
Transférer 1ml de la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube.

10

Ajouter 600 µl de chloroforme pour éliminer le phénol et mélanger en inversant le tube.

11

Centrifuger a 12 000 tours /min pendant 8min.


12
Transférer la couche aqueuse dans un nouveau tube.
13
Ajouter 2 à 3 volumes d'éthanol absolue froid conservé préalablement à -20°C.
14
Incuber les tubes à -20°C pendant 1h30min.
15
Centrifuger a 12 000 tours /min à 4°C pendant 18 min.
16
Jeter le surnageant et rincer le culot d'ADN avec 1 ml d'éthanol 70%.
17
Centrifuger a 12000 tours /min pendant 5 min.
18
Jeter le surnageant et sécher le culot à 37 °C dans le bain marie sec.
19
Remettre l'ADN en suspension avec 350 µl de TE buffer.

1.1.1. Reconstitution des amorces :

Après une centrifugation d'une minute des tubes contenant les amorces, un volume d'eau RNase DNase Free (x µl) correspondant à la quantité en nmol indiquée sur les tubes a été ajouté (sans toucher les parois du tube ni aspirer ou refouler). Les tubes ont ensuite été laissés à température ambiante pendant 10 minutes avant d'être homogénéisés par un vortex. Par la suite, une dilution de 1/50ème a été effectuée afin d'obtenir une solution fille a 20 µM.

1.1.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

La réaction de PCR a été réalisée en utilisant 2 mélanges réactionnels différents. La détection des gènes *stx1*^{a}, *stx2*^{b}, *iroN, ipr2, cnf1, TEM, tet(A), qnr, cmlA et dfrA1* a été effectuée dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant 0.133 µl de HOT FIREPol®, 2 µl de Buffer B1, 2 µl $MgCl_2$, 0.2 µl dNTP, 0.6 µl d'amorce sens, 0.6µl d'amorce anti-sens, 9.47 µl d'eau Ultrapure™, 5 µl d'ADN à amplifié. La détection des gènes *eae*^{c}, *afa, ompT et aac(3)II* a été effectuée dans un mélange réactionnel de 25 µl contenant 0.62 µL de la Taq polymérase, 5 µl de complet buffer, 0.5 µl dNTP, 0.75 µl d'amorce sens, 0.75µl d'amorce anti-sens, 12.38 µl d'eau Ultrapure™ et 5 µl d'ADN à amplifié. Les amorces utilisées dans cette réaction ainsi que les températures de fusion utilisées pour chaque amorce sont présentées dans (Tableau V.6).

Le mélange réactionnel a été versé dans des barrettes à PCR (FigureV.8. B), ensuite, ils ont été placés dans le thermocycleur (Figure V.8.A) pour l'amplification, et ce dernier a été réglé selon le protocole suivant :

La première étape consistait en une dénaturation initiale à une température de 95°C pendant 15 minutes. Ensuite, les étapes de dénaturation (95°C pendant 30 secondes), d'hybridation (à une température de fusion spécifique Tm, pendant 30 secondes) et d'élongation (à 72°C pendant 1 minute par kilobase) ont été répétées 40 fois pour effectuer un total de 40 cycles d'amplification. Après les 40 cycles, une étape d'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 5 minutes pour garantir une complète extension des amplicons. Ces cycles répétés

permettent une amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible, aboutissant à une quantité suffisante d'amplicons pour la détection et l'analyse ultérieures.

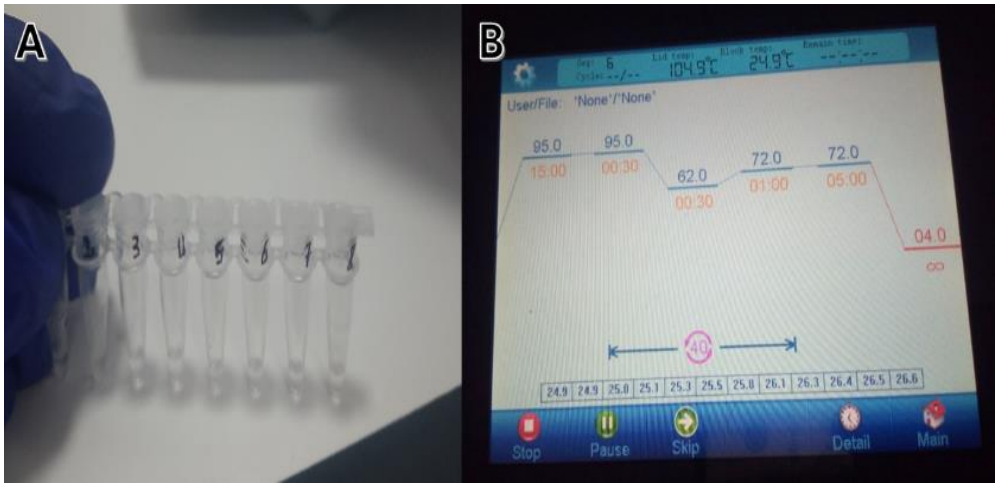


Figure V.8:A: thermocycleur. B: Barrettes contenant le melange reactional (photo originale 2023).

Tableau V.6 : Amorces utilisées en PCR et températures de fusion correspondantes.

Gene	Primer	Oligonucléotide séquence (5′–3′)	Fragment size (bp)	Tm(° C)	Références
stx1[a]	*VT1-A* *VT1-B*	(F) CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC(R) CGTGGTATAGCTACTGTCACC	302	64	(Salih et al. 2014)
stx2[b]	*VT2-A* *VT2-B*	(F) CTTCGGTATCCTATTCCCGG (R) CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC	513	62	(Kobayashi et al. 2003)
afa	*afa1* *afa2*	(F) GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC (R) CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750	63	(Mand et al. 2021)
eae[c]	*EAE-1* *EAE-2*	(F) GAGAATGAAATAGAAGTCGT (R) GCGGTATCTTTCGCGTAATCGCC	775	60	(Salih et al. 2014)
iroN	*IRONE C- F* *IRONE C-R*	(F) AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG (R) GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	60	Motionnée dans le tube
cnf1	*cnf* *cnf2*	(F) AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG (R) TGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498	62	(Mandana Lotfi, Hassan Momtaz 2021)
ipr2	*Irp2-F* *Irp2-R*	(F) AAGGATTCGCTGTTACCGGAC (R) AACTCCTGATACAGGTGGC	413	60	(Ewers et al. 2005)
ompT	*ompT-F*	(F) ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	559	58	Motionnée dans

	ompT-R	(R) CCCGGGTCATAGTGTTCATC			le tube
Beta-lactams	*TEM*	(F) CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC(R) CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	60.2	(Ashmony et al. 2022)
Chloramphenicol	*cmlA*	(F) CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC(R) CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	698	55	(Momtaz and Jamshidi 2012)
Tetracycline	*tet(A)*	(F) GGTTCACTCGAACGACGTCA (R) CTGTCCGACAAGTTGCATGA	577	62	(Momtaz and Jamshidi 2012)
Quinolones	*qnr*	(F) GGGTATGGATATTATTGATAAAG(R) CTAATCCGGCAGCACTATTTA	670	55	(Momtaz and Jamshidi 2012)
Trimethoprim	*dfrA1*	(F) GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC(R) GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	367	55	(Momtaz and Jamshidi 2012)
Aminoglycosides	*aac(3) II*	(F) ACTGTGATGGGATACGCGTC® (R) CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	237	62	(Momtaz and Jamshidi 2012)

V.5.6.2. Electrophorèse du produit de PCR :

a. Préparations pour l'électrophorèse :

- Préparation du TBE 0.5%:

1litre d'eau distillé stérile a été introduit dans un bécher stérile et 5.4 g de tris base, 2.75 g d'acide borique et 2 ml d'EDTA ont été ajoutés, après la préparation a été mélangée à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à homogénéisation.

- Préparation du gel d'agarose (grand gel) :

Pour préparer un gel d'agarose de 1.5%, 3 g de la poudre d'agarose ont été introduit d'abord dans un flacon en verre stérile de 200 ml et 200 ml du tampon TBE 0,5% y ont été ajoutés. La préparation a été portée ensuite au micro-onde sans bouchon pendant 3min pour fondre le gel et obtenir un mélange homogène. Sous une hotte microbiologique le mélange a été versé dans deux flacons de 50 ml et 1 µl de Gel Stain a été ajouté à chaque flacon, enfin, le gel a été coulé dans un support contenant des peignes et a été laissé sous la hotte à température ambiante pendant 15-20 min pour la polymérisation.

b. L'électrophorèse :

Le gel d'agarose préparé précédemment a été immergé dans la cuve d'électrophorèse contenant une quantité suffisante de tampon TBE (FigureV.9). Dans le premier puit du gel 2.5µl de poids moléculaire (Ladder) ont été ajoutée, ensuite, 6 µl du produit de PCR ont été mélangé avec 2µl de Bleu de charge (Loading buffer) afin de donner un poids à l'ADN. Ce mélangé a été versé dans le 2ème puit et ainsi de suite pour les autres échantillons.

La séparation des produits de PCR a été réalisée par électrophorèse à une tension de 135V pendant 20 minutes. Par la suite, la visualisation des bandes d'ADN a été effectuée à l'aide d'un Trans illuminateur UV (Figure V.9).

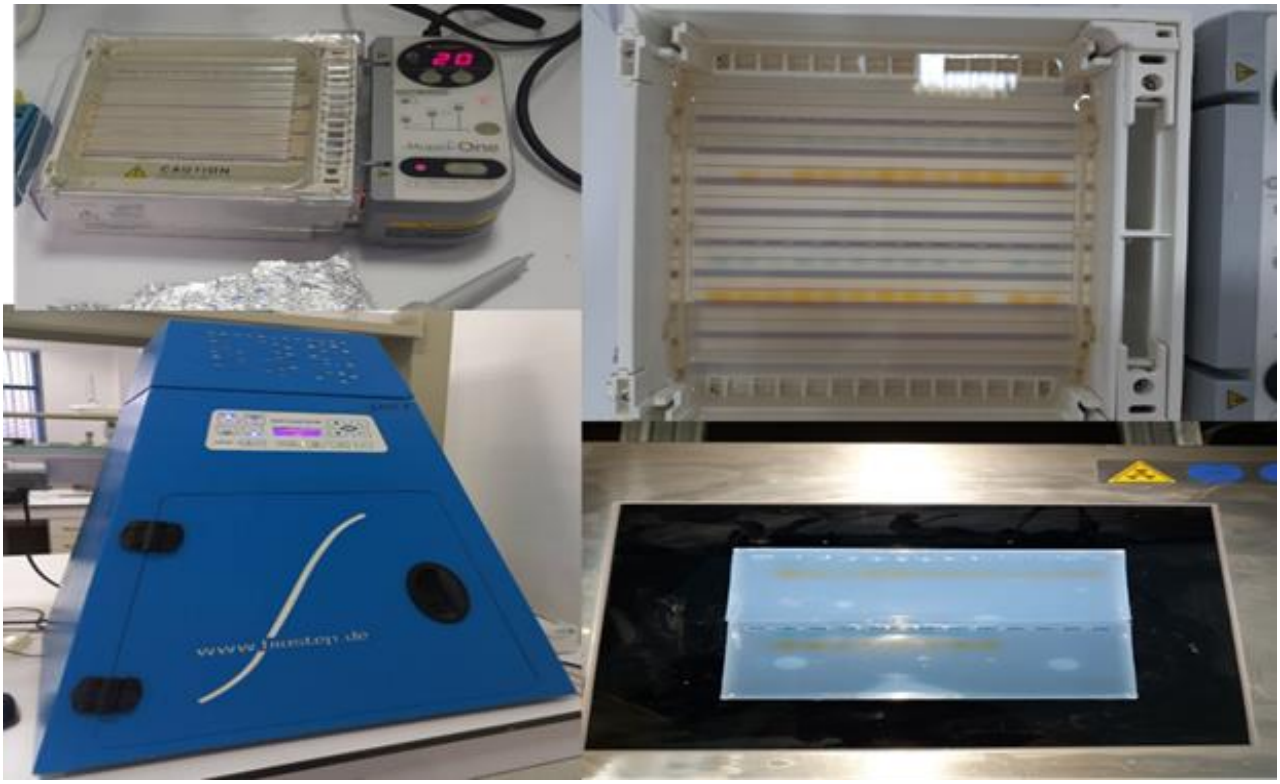


Figure V.9: électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des résultats (photo originale2023).

Résultats

V.6. Résultats

V.6.1. Répartition des résultats d'infection par *Escherichia coli* entérohémorragique selon l'âge et le sexe

Figure représente la distribution des cas d'infection par EHEC selon l'âge et le sexe dans la région de Médéa.

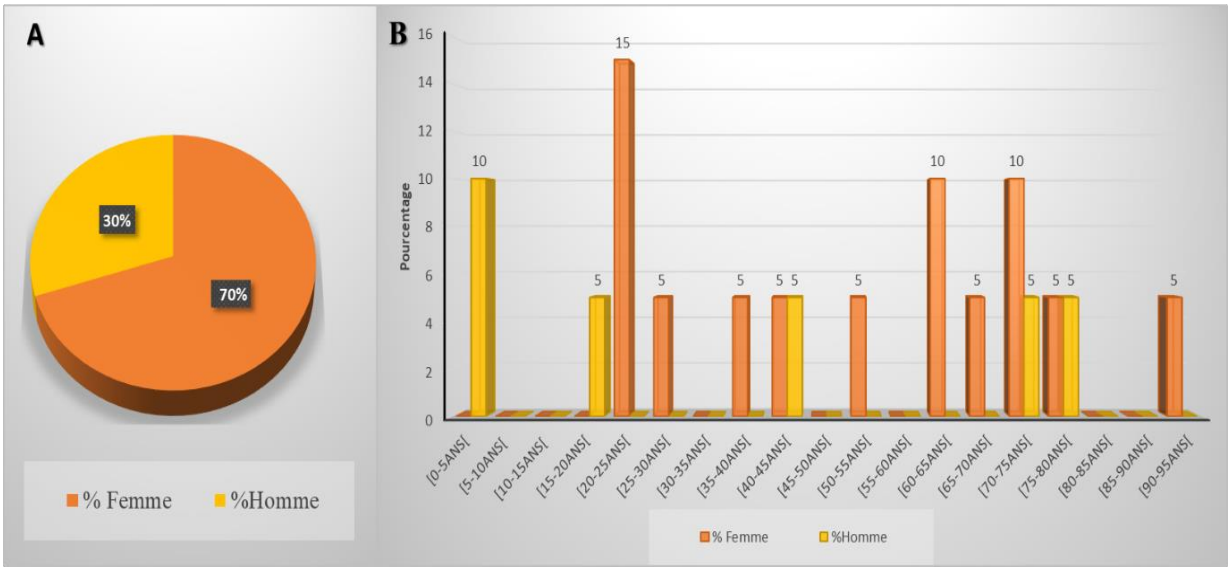


Figure V.10: A. Distribution globale des souches d'EHEC selon le sexe B. Répartition des résultats d'infection par EHEC selon le sexe et l'âge.

Ces résultats indiquent que l'infection par EHEC est plus fréquente chez les femmes, qui représentent environ 70% des cas.

Selon l'histogramme, les classes d'âge sont reparties entre 0 et 95 ans avec un intervalle de 5 ans. Les classes de 0 à 5 ans et de 15 à 20 ans sont dominées par le sexe masculin, le taux d'infection est de 10% et 5% respectivement. En revanche, une prédominance féminine est enregistrée dans la classe [20-25ans[soit 15%, ainsi que dans les groupes d'âge [25-30ans[, [35-40ans[, [50-55ans[, [60-70ans[et [90-95ans[qui présentent tous une proportion d'infection de 5%. Pour le reste aucun cas d'infection par EHEC n'a été enregistré chez les deux sexes a l'exception des catégories [40-45[et [75-80[qui présentent un faible pourcentage d'infection soit 5%.

En récapitulant, La répartition d'infection par EHEC chez les enfants, est plus fréquente pour le sexe masculin cependant le taux d'infection chez les adultes est dominé par les femmes.

V.6.2. Résultats d'antibiogrammes :

Les résultats de chaque antibiotique testé sur les souches étudiées selon les critères résistance, sensibilité et intermédiaire des patients dans le cadre des infections urinaires par EHEC sont représentés dans les figures v.11 et v.12 :

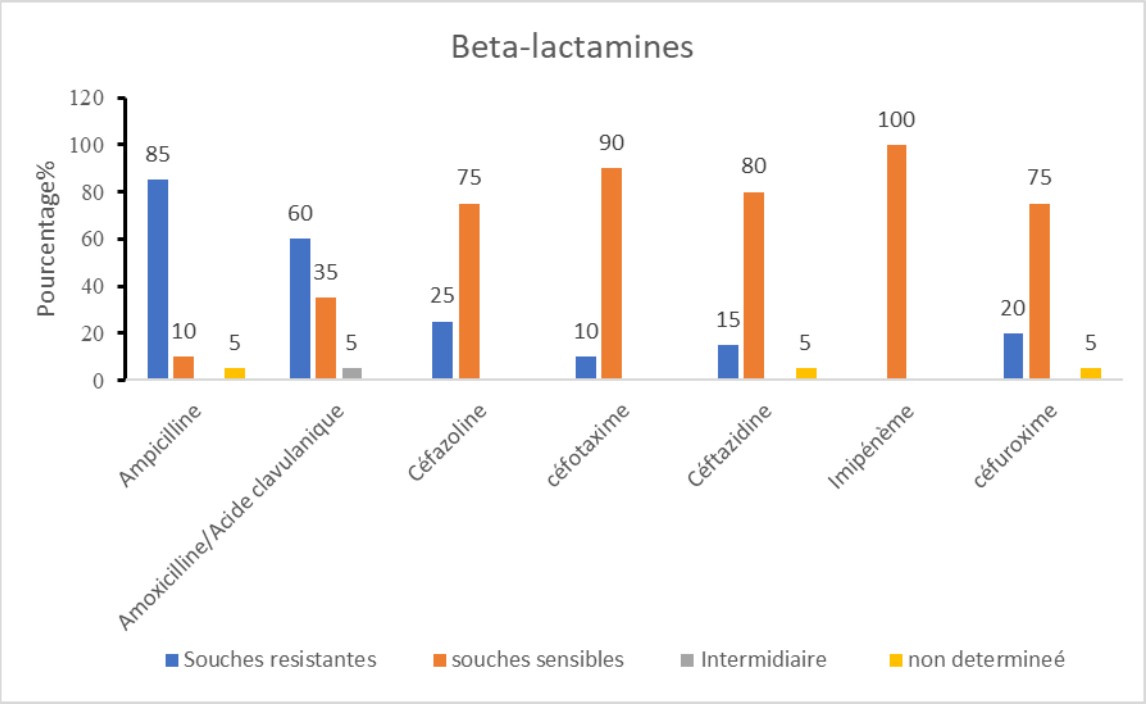


Figure V.11: Profil de résistance d'EHEC vis-à-vis les Beta-lactamines.

Les résultats obtenus révèlent une différence significative de résistance et de sensibilité des souches d'EHEC vis-à-vis les différents antibiotiques de la famille des bêta-lactamines. On observe un taux élevé de sensibilité à la Céfazoline, Céfotaxime, Céftazidine et Céfuroxime, variant entre 75% et 90%, suivi d'une sensibilité totale à l'Imipénème. En revanche, 45% des souches présentent une faible sensibilité à l'Ampicilline et à l'Amoxicilline/Acide clavulanique. De plus, un taux élevé de résistance est observé envers l'Ampicilline et l'Amoxicilline/Acide clavulanique, tandis que les souches étudiées présentent une faible résistance à la Céfazoline, Céfotaxime, Céftazidine et Céfuroxime.

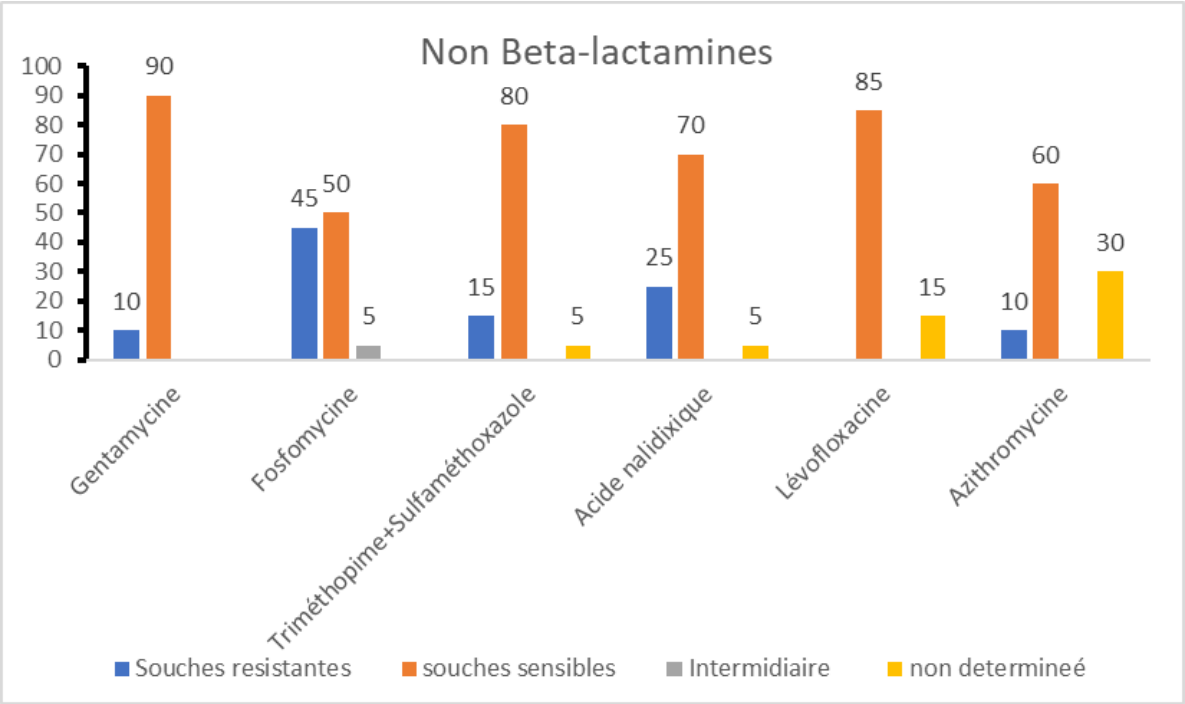


Figure V.12: Figure 1: Profil de résistance d'EHEC aux différents antibiotiques

L'analyse de la sensibilité des souches d'EHEC aux antibiotiques a révélé des taux de sensibilité élevés compris entre 60% et 90% pour la plupart des antibiotiques, à l'exception de la Fosfomycine qui présente un taux de sensibilité moyen de 50%. En revanche, les souches montrent une proportion faible à modérée de résistance à ces antibiotiques.

V.6.3. Biologie moléculaire

Les résultats obtenus par la réaction de la polymérisation en chaine pour la détection des gènes de virulences et de résistance ainsi que la séparation et la visualisation par électrophorèse sont représentés par les figures (V.13), (V.14), (V.15), (V.16), (V.17), (V.18) et (V.19) ci-dessous :

1.1.3. Gènes de resistance :

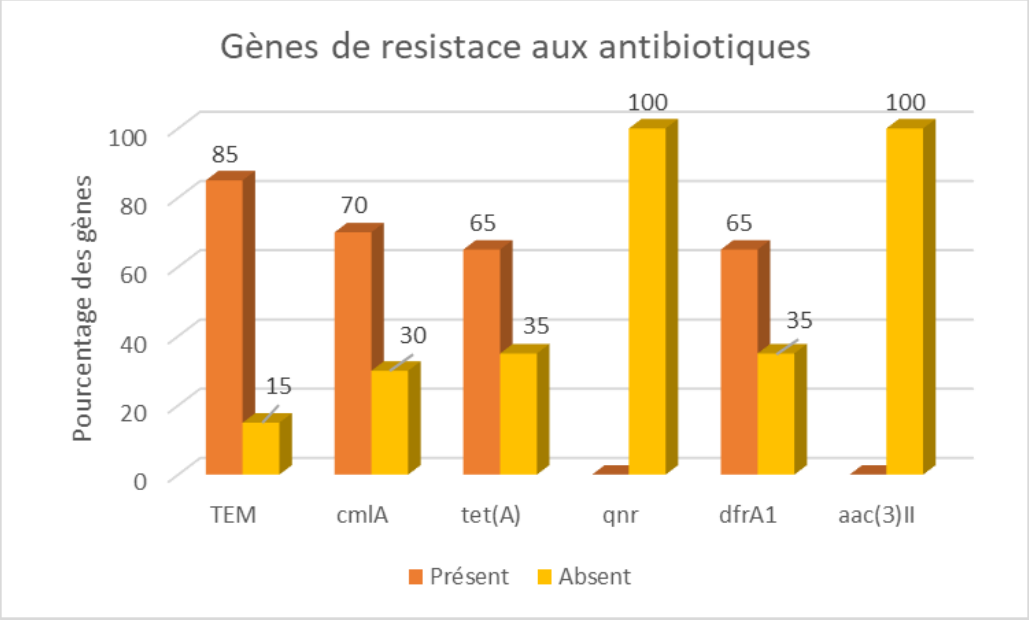


Figure V.1: Répartition des gènes de résistance aux antibiotiques chez EHEC.

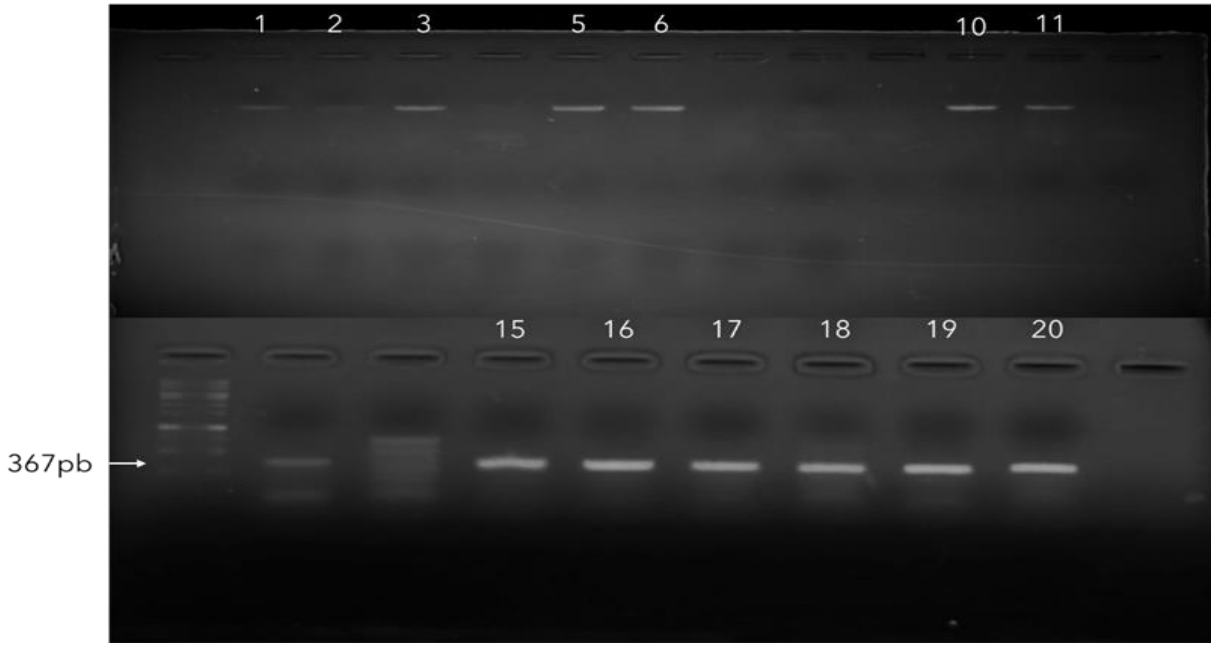


Figure V.2: Résultat de l'électrophorèse du gène *dfrA1* (photo originale 2023).

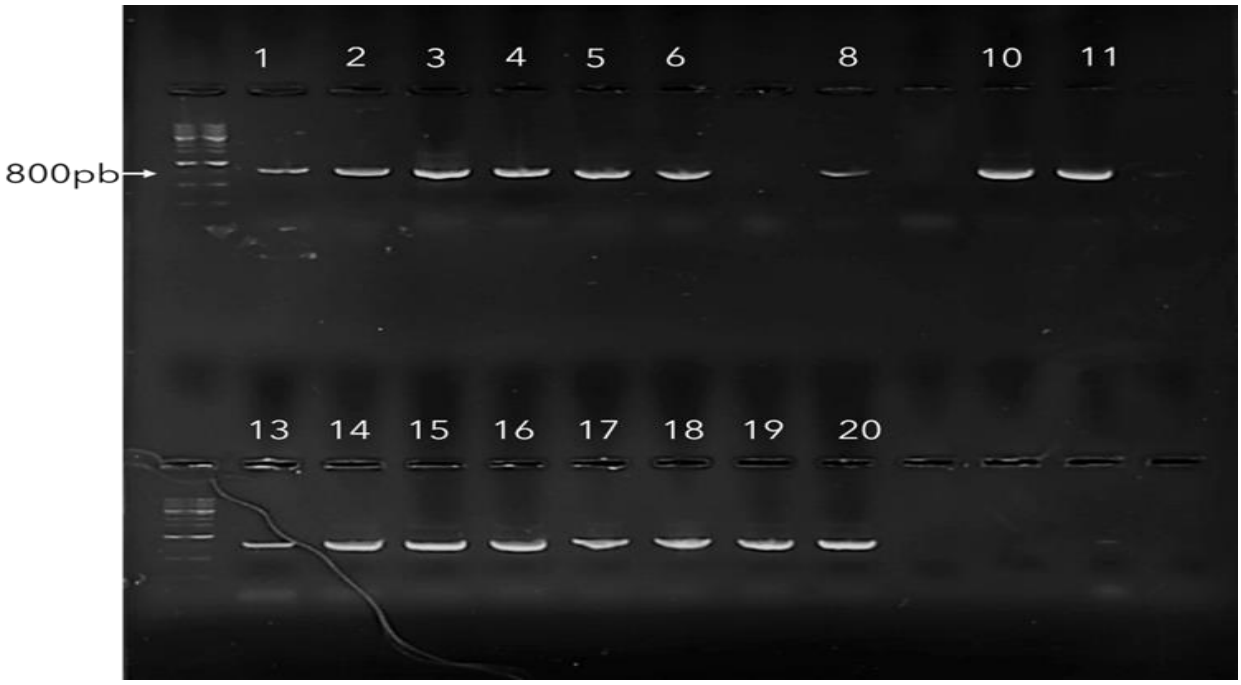


Figure V.3: Résultat de l'électrophorèse du gène *TEM* (photo originale 2023).

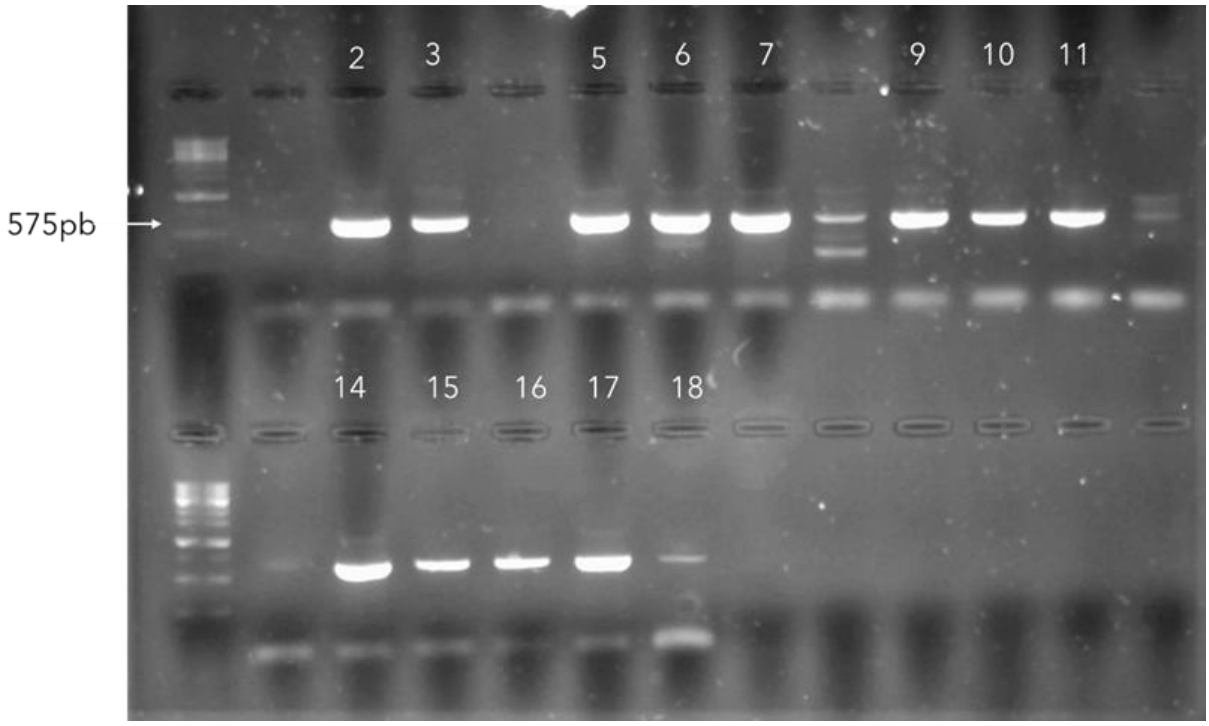


Figure V.4: Résultat de l'électrophorèse du gène *tet(A)* (photo originale 2023).

Cette étude révèle la présence de la majorité des gènes de résistance, notamment *TEM, cmlA, tet(A)* et *dfrA1*, avec un pourcentage élevé compris entre 65% et 85%. Parmi ces gènes, *TEM* se caractérise par le taux de présence le plus élevé. En revanche, l'absence des gènes *qnr* et *aac(3)II* dans toutes les souches étudiées.

V.6.3.2. Gènes de virulence :

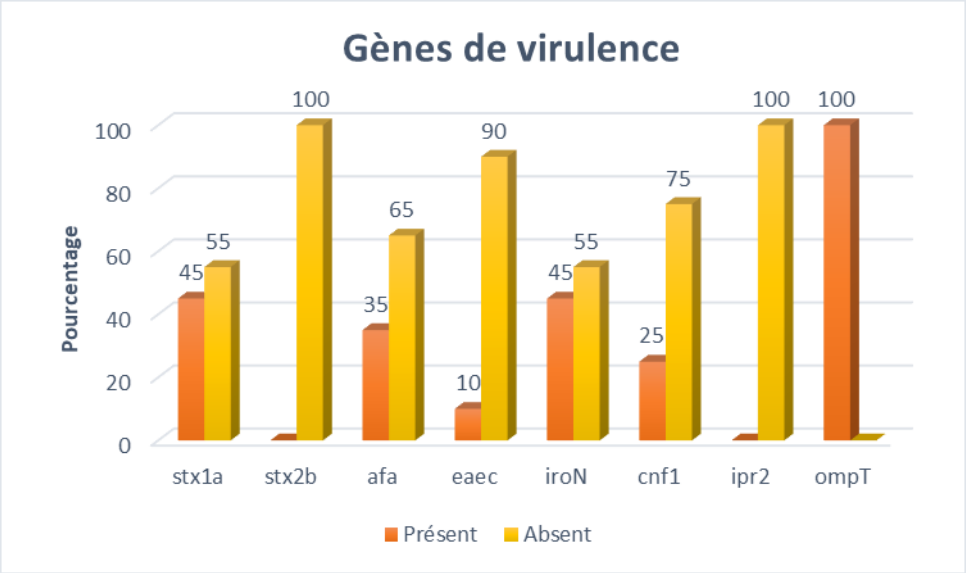


Figure V.17: Répartition des gènes de virulence chez EHEC.

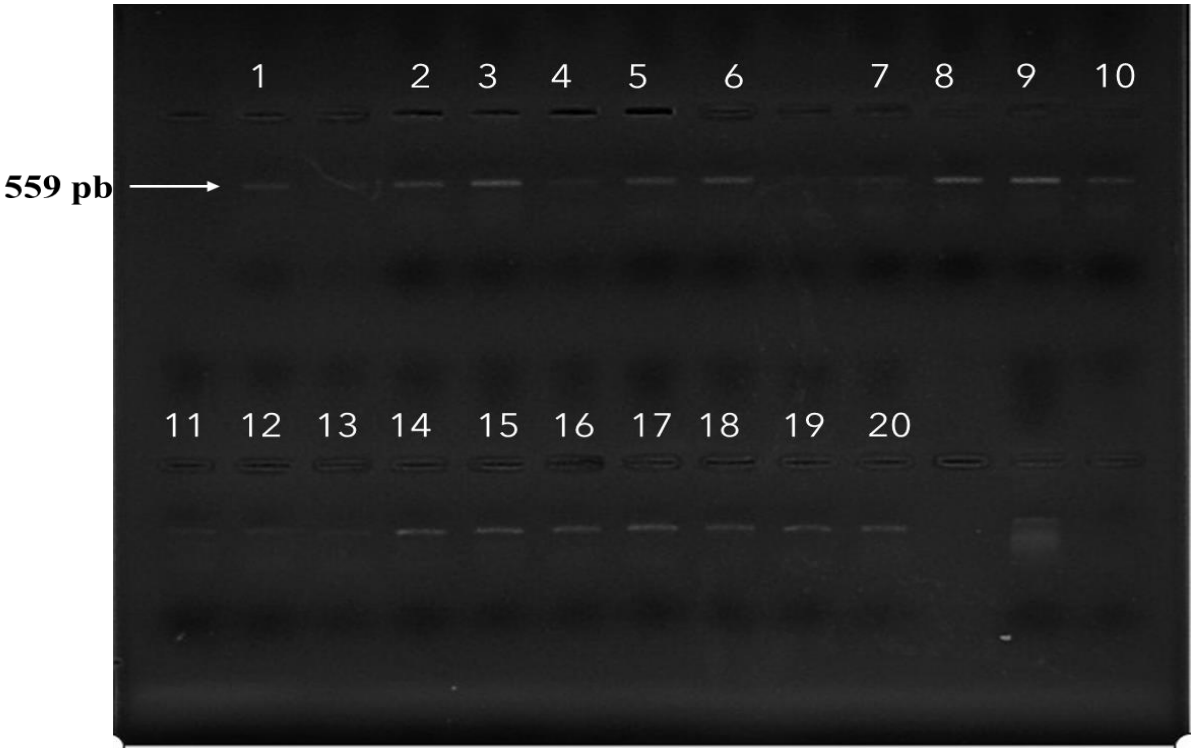


Figure V.18: Résultat de l'électrophorèse du gène *ompT* (photo originale 2023).

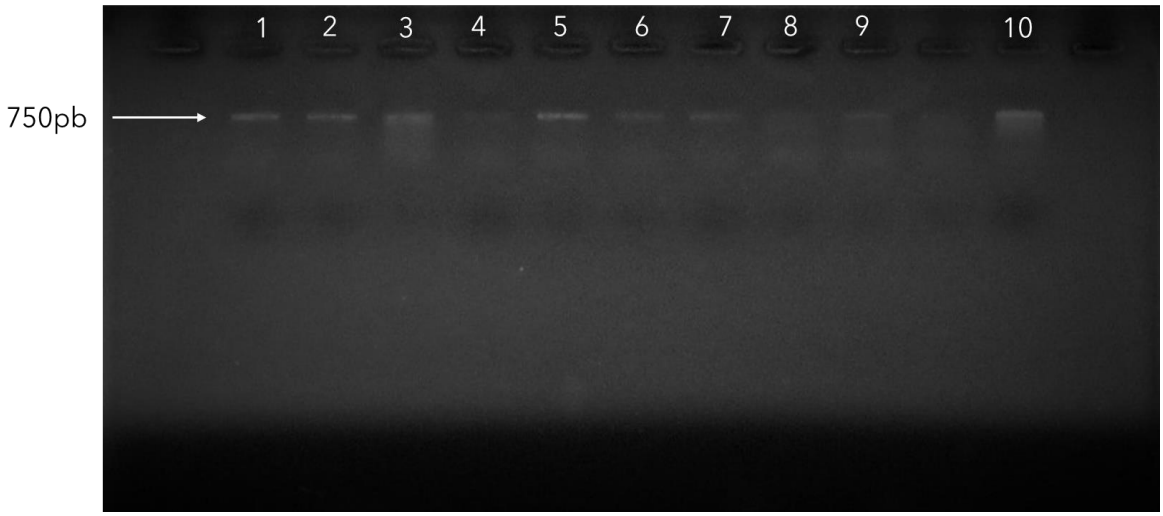


Figure V.19: Résultat de l'électrophorèse du gène *afa* (photo originale 2023).

D'après l'histogramme, on observe l'absence des gènes *stx2*^{b} et *ipr2* dans toutes les souches étudiées, tandis que la présence du gène *ompT* est de 100%. La présence des gènes *stx1*^{a}*, afa, iroN* et *cnf1* est observée avec des proportions variables, allant de 25% à 45%. En revanche, le gène *eae*^{c} a une faible fréquence de présence, soit 10%.

V.6.3.3. Répartition des souches en différents clades selon la diversité génétique :

Les tableaux (V.7), (V.8) et (V.9) présentent les variations génétiques et le regroupement en clades de la population bactérienne EHEC étudiée.

Tableau V.7: Diversité génétique des gènes de virulence et de resistance.

Souche	*stx1*^{a}	*stx2*^{b}	*afa*	*eae*^{c}	*iroN*	*cnf1*	*ipr2*	*ompT*	*TEM*	*cmlA*	*tet(A)*	*qnr*	*dfrA1*	*aac(3)II*	*clade*
11	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	1
16	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	
15	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	2
3	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	3
10	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	
2	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	4
1	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	5
18	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	6
19	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	7
17	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	8
5	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	9
6	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	
20	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	10
4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	11
8	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	12

7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	13
14	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	14
13	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	15
9	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	16
12	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	17

+ : Présence du gène - : Absence du gène

En termes de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques une vaste diversité génétique a permis de regrouper les 20 souches étudiées en 17 clades. Parmi lesquels 3 clades (1, 3 et 9) comprennent 2 souches, et chacun des autres clades est représenté par une seule souche.

Tableau V.8: Diversité génétique des gènes de virulence.

Souche	*stx1*[a]	*stx2*[b]	*afa*	*eae*[c]	*iroN*	*cnf1*	*ipr2*	*ompT*	Clades
11	+	-	-	-	-	+	-	+	1
16	+	-	-	-	-	+	-	+	
15	+	-	-	-	+	+	-	+	2
3	+	-	+	-	-	+	-	+	3
10	+	-	+	-	-	+	-	+	
2	+	-	+	-	-	-	-	+	4
1	+	-	+	-	-	-	-	+	
18	-	-	-	+	-	-	-	+	5
19	-	-	-	+	-	-	-	+	
17	-	-	-	-	+	-	-	+	6
5	-	-	+	-	+	-	-	+	7
6	-	-	+	-	+	-	-	+	
20	-	-	-	-	+	-	-	+	8
4	-	-	-	-	-	-	-	+	9
8	-	-	+	-	-	-	-	+	10
7	+	-	-	-	-	-	-	+	11
14	+	-	-	-	+	-	-	+	12
13	-	-	-	-	+	-	-	+	13
9	-	-	-	-	+	-	-	+	
12	-	-	-	-	+	-	-	+	

+ : Présence du gène - : Absence du gène

Les souches étudiées dans cette recherche représentent une grande diversité génétique en termes de gènes de virulence, et ont été regroupées en plusieurs clades. Au total, 13 clades différents ont été identifiés, parmi lesquels le clade 13 qui se distingue par sa variété et regroupe trois souches. Les clades 1, 3, 4, 5 et 7 sont également présents avec deux souches chacun. De plus, chaque autre souche a été attribuée à un clade distinct.

Tableau V.9: diversité génétique des gènes de resistance.

Souche	*TEM*	*cmlA*	*tet(A)*	*qnr*	*dfrA1*	*aac(3)II*	Clade	Pourcentage
11	+	+	+	-	+	-	1	50%
16	+	+	+	-	+	-		
15	+	+	+	-	+	-		
3	+	+	+	-	+	-		
10	+	+	+	-	+	-		
2	+	+	+	-	+	-		
18	+	+	+	-	+	-		
17	+	+	+	-	+	-		
5	+	+	+	-	+	-		
6	+	+	+	-	+	-		
1	+	+	-	-	+	-	2	15%
19	+	+	-	-	+	-		
20	+	+	-	-	+	-		
8	+	-	-	-	-	-	3	10%
13	+	-	-	-	-	-		
7	-	-	+	-	-	-	4	10%
9	-	-	+	-	-	-		
4	+	+	-	-	-	-	5	5%
14	+	-	+	-	-	-	6	5%
12	-	-	-	-	-	-	7	5%

+ : Présence du gène - : Absence du gène

Les souches examinées ont été classées en 7 clades en fonction des similarités de présence et d'absence des gènes de résistance. Le clade le plus vaste est le clade 1, qui comprend 50% des souches, suivi du clade 2 qui contient 3 souches. Les clades 3 et 4 regroupent chacun 2 souches, tandis que les 3 autres clades sont représentés par une seule souche chacun.

V.6.3.4. Comparaison des résultats génotypique et phénotypique :

Les tableaux ci-dessous présentent la comparaison entre les résultats phénotypique des souches obtenus par antibiogramme et génotypique obtenus par PCR.

Tableau V.10: Résultats du phénotype de résistance vis-à-vis les bêtalactamines et le génotype (gène TEM).

	Génotype	Phénotype						
Souche	TEM	Ampicilline	Amoxicilline/Acide clavulanique	Céfazoline	céfotaxime	Céftazidine	Imipénème	céfuroxime
1	Présent	R	R	R	R	R	S	R
2	Présent	R	S	S	S	S	S	S
3	Présent	R	R	S	S	S	S	S
4	Présent	R	R	R	R	R	S	R
5	Présent	R	R	S	S	S	S	S
6	Présent	R	R	R	S	S	S	S
7	Absent	R	R	S	S	S	S	S
8	Présent	S	S	S	S	S	S	S
9	Absent	R	S	S	S	S	S	S
10	Présent	S	S	S	S	S	S	S
11	Présent	R	R	S	S	S	S	S
12	Absent	R	S	R	S	R	S	R
13	Présent	R	S	S	S	S	S	S
14	Présent	R	R	S	S	S	S	S
15	Présent	R	R	S	S	S	S	S
16	Présent	R	R	S	S	S	S	S
17	Présent	R	R	S	S	S	S	S
18	Présent	R	R	S	S	S	S	R
19	Présent	S	S	R	I	R	S	S
20	Présent	ND	S	ND	S	S	S	ND

R : Résistante S : Sensible I : Intermédiaire ND : Non déterminée

La majorité des souches analysées qui possèdent le gène de résistance aux bêtalactamines (*TEM*), sont résistantes aux pénicillines (l'ampicilline et l'amoxicilline/acide clavulanique). Cependant, certaines incohérences sont observées, où l'on constate la sensibilité des souches malgré la présence du gène, ou la résistance des bactéries malgré son absence. En ce qui concerne les céphalosporines, la majorité des souches sont sensibles, même si le gène *TEM* est présent.

Tableau V.11: Résultats du phénotype de résistance vis-à-vis les quinolones et les aminoglycoside et le génotype.

	Génotype	Phénotype	Génotype	Phénotype
Souche	*aac(3)II*	Gentamycine	*qnr*	Acide nalidixique
1	Absent	R	Absent	R
2	Absent	S	Absent	R
3	Absent	S	Absent	S
4	Absent	R	Absent	R
5	Absent	S	Absent	S
6	Absent	S	Absent	S
7	Absent	S	Absent	S
8	Absent	S	Absent	S
9	Absent	S	Absent	S
10	Absent	S	Absent	R
11	Absent	S	Absent	S
12	Absent	S	Absent	S
13	Absent	S	Absent	S
14	Absent	S	Absent	S
15	Absent	S	Absent	S
16	Absent	S	Absent	S
17	Absent	S	Absent	S
18	Absent	S	Absent	R
19	Absent	S	Absent	S
20	Absent	S	Absent	ND

R : Résistante S : Sensible I : Intermédiaire ND : Non déterminée

En comparant les résultats phénotypiques de l'antibiogramme pour les antibiotiques Gentamicine de la famille des Aminoglycosides et l'Acide nalidixique de la famille des Quinolones avec les résultats génotypique pour les gènes *aac(3)II* et *qnr,* on observe que la plupart des souches sensibles à ces antibiotiques ne possèdent pas les gènes de résistance correspondants. Cependant, certains cas présentent des incohérences entre les phénotypes et les génotypes, où l'on constate la sensibilité des souches malgré la présence des gènes de résistance, ou le contraire.

Discussion

Dans cette étude, une investigation sur les souches *d'Escherichia coli* entérohémorragique circulantes ainsi que la détection des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques par PCR chez les souches *d'Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) isolées à partir des prélèvements urinaires de la population de Médéa a été mise en évidence. Notre travail a analysé un total de 20 souches d'EHEC.

Les résultats de cette étude ont révélé un taux de 1,57% d'EHEC (trois souches ont été identifiées en tant qu'EHEC parmi 190 *E.coli* collectés entre le 4 décembre 2022 et le 8 mars 2023). En revanche, une proportion de 18% d'EHEC avait été enregistrée entre mars et mai 2022 (parmi 100 souches d'*E.coli*, 18 souches avaient été identifiées comme étant des EHEC) (BENKORTB and BENBRIH 2022). Ces résultats sont proches à ceux obtenus en Est de la Turquie qui ont marqués une prévalence de 2.7% d'EHEC isolée à partir des selles de l'homme (Kalin et al. 2012). Par ailleurs en Espagne les études menées par (Mora et al. 2004) et (Mora et al. 2004) ont révélés un taux de 39,18% et 33,33% respectivement, ces résultats pourrait être liés au niveau de vie en raison que les épidémies a EHEC surviennent principalement dans les pays à niveau de vie élevé (Lemaignen et al. 2013).

Pour ce qui concerne la répartition des résultats d'infection par EHEC selon le sexe et l'âge, les résultats indiquent une prévalence plus élevée de l'infection par EHEC chez les femmes, représentant environ 70% des cas. De plus, les résultats montrent une répartition différente des infections selon les groupes d'âge et le sexe. Les femmes présentent une prédominance dans plusieurs tranches d'âge, notamment de 20 à 95 ans. Cela suggère que des facteurs spécifiques liés à l'âge et au sexe peuvent influencer la susceptibilité aux infections urinaires. Parmi ces facteurs, on trouve Les différences biologiques, comme l'anatomie de l'appareil urinaire, joue un rôle dans les infections urinaires. L'urètre chez les hommes agit comme une barrière contre les bactéries, grâce à son sphincter et à sa longueur plus importante. Chez les femmes, l'anatomie du petit bassin, avec la proximité de l'anus, du vagin et la brièveté de l'urètre, favorise les infections urinaires (Stéphanie VORKAUFER 2011), les différences hormonales entre les deux sexes, telles que la ménopause et la grossesse chez les femmes, entraînent des changements physiologiques, des fluctuations hormonales et une diminution des défenses immunitaires. Ces modifications rendent le corps, en particulier la flore vaginale, plus vulnérable aux infections virales et bactériennes. Ce déséquilibre peut conduire au développement d'infections vaginales qui, dans certains cas, peuvent se propager vers l'urètre, entraînant ainsi une infection urinaire (Samiya, Sabrina, and ATTI 2020).

De plus, Les enfants de sexe masculin sont plus touchés dans la classe d'âge de 0 à 5 ans (l'enfant infecté dans cette classe d'âge est de 18 mois) et cela pourrait être due qu'il n'est pas encore circoncis, et il semble considérablement que la circoncision réduise l'incidence des infections urinaires au cours des premiers mois de vie (Solomon 2001).

Cependant, il est important de noter que les pourcentages d'infection dans la plupart des groupes d'âge sont relativement faibles, allant de 5% à 15%. Cela indique que l'infection par EHEC ne représente qu'une petite proportion de la population dans chaque groupe d'âge, ce qui souligne l'importance des mesures de prévention et de contrôle pour réduire la propagation de l'infection.

Pour ce qui est la répartitions des souches selon l'antibiosensibilité, les souches étudiées présentent une variabilité significative de la résistance et de la sensibilité à différents antibiotiques de la famille des bêtalactamines. Les souches présentent une sensibilité élevée entre 75% et 90% à certains antibiotiques tels que la Céfazoline, la Céfotaxime, la Céftazidine et la Céfuroxime, tandis que la résistance est plus marquée envers l'Amoxicilline/Acide clavulanique et l'Ampicilline soit 60% et 85% respectivement. En Espagne l'étude réalisée par (Mora et al. 2005) a montré une sensibilité totale envers Amoxicilline /Acide clavulanique, Céfazoline, la Céfotaxime, la Céftazidine, la Céfuroxime, et imipénéme et faible résistance vis-à-vis l'Ampicilline tandis que en Mangolie (Yandag et al. 2023) 50% des souches EHEC étaient résistantes à l'Ampicilline et 16.7% étaient résistantes à la Céftazidine.

L'étude portant sur la sensibilité des souches d'EHEC à différents antibiotiques autres que bêtalactamines a révélé des taux élevés de sensibilité (60% à 90%) pour la plupart des antibiotiques testés, à l'exception de la Fosfomycine qui a montré une sensibilité moyenne. Les souches présentent une proportion faible à modérée de résistance à ces antibiotiques. Ces résultats soulignent l'efficacité potentielle de ces antibiotiques dans le traitement des infections a EHEC. En Espagne, l'étude menée par (Mora et al. 2005) a montré une sensibilité de 100% envers la Gentamycine et de 98% vis-à-vis l'Acide nalidixique, en revanche l'étude menée en Mangolie par (Yandag et al. 2023) a révélé une résistance de 16.7% à la Gentamycine et de 50% aux Triméthoprime + sulfaméthoxazole.

Concernant les résultats de la PCR pour détecter les gènes de résistance aux antibiotiques, l'étude révèle une forte présence des gènes de résistance *TEM, cmlA, tet(A)* et *dfrA1*, avec un pourcentage élevé de 65% à 85%. En revanche, les gènes *qnr* et *aac(3)II* sont absents dans toutes les souches étudiées.

Les résultats de la PRC montrent que le gène de résistance *TEM* est largement répandu parmi les souches analysées, avec une présence observée chez 85% des souches. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études menées en Egypte, où toutes les souches examinées dans certaines régions, comme Dakahlia en Egypte (Elafify et al. 2022) étaient porteuses du gène *TEM*. Cependant, il est intéressant de noter qu'une étude menée à Mansoura en Egypte par (Younis et al. 2017) a montré une proportion plus faible de souches possédant ce gène, soit 25%. Ces variations régionales peuvent être dues à des facteurs tels que la diversité génétique des souches, les pratiques d'utilisation des antibiotiques et les profils de résistance spécifiques à chaque région. De plus, une étude menée en Jordanie (Tarazi et al. 2021) a également rapporté une proportion de 33,33% de souches porteuses du gène *TEM*. Bien que cette proportion soit intermédiaire par rapport aux autres études mentionnées, elle indique également une présence significative de ce gène dans la région étudiée.

En outre, les résultats ont révélé l'absence totale du gène *qnr* et *aac(3)II* dans les souches analysées. Cependant, des études menées dans différentes régions de l'Iran ont détecté la présence variable du gène *qnr* allant de 41,66% à 100% (Mashak 2018) (Momtaz and Jamshidi 2012) (Momtaz, Safarpoor Dehkordi, et al. 2012).

Les gènes *dfrA1* et *cmlA* ont été présent dans 65% et 70% des souches étudiées respectivement. Comparativement, dans les souches étudiées dans une autres étude en Iran (Karimpour et al. 2019), les taux de présence étaient de 63.15% et 5.26% pour les gènes *dfrA1* et *cmlA* respectivement. Le gène *tet(A)* présente un taux de présence de 65% alors qu'en Egypte un taux de présence de 100% a été marqué par (Younis et al. 2021).

Concernant les résultats de la PCR pour détecter les gènes de virulence d'EHEC montrent que seulement 9/20 souches (soit 45%) possèdent le gène $stx1^a$, alors que le gène $stx2^b$ était absent dans les 20 souches étudiées. Ces résultats sont proche de ceux obtenus au Nigeria par (Oluyege and Famurewa 2015) où le gène $stx2^b$ était absent à 100%. En revanche, l'étude menée par (Salih et al. 2014) dans la wilaya de Tlemcen sur divers échantillons de viande de bœuf provenant de différents pays étrangers. Ils ont Trouvé que le gène $stx1^a$ était présent chez 20% des souches étudiées, tandis que le gène $stx2^b$ était présent à 100%. Cette disparité pourrait être attribuée aux différentes souches qui circulent dans la richesse animalier des pays à partir desquels la viande était importée.

Cependant le gène eae^c qui code pour l'intimine qui provoque la diarrhée (et encourage les colites hemorragiques) chez l'être humain par une capacité d'attachement et d'effacement (A/E)

(Kalin and Öngör 2014) était présent avec un faible pourcentage de 10% ce qui signifie que la majorités des souches étudiées sont des souches atypiques (les souches qui ne possèdent pas le gène *eae*). Ces résultats contredisent avec celui obtenues par (Rahimi et al. 2012) qui ont trouvés que 100% des souches possédaient le gène *eae*^{c}.

Les résultats de cette étude ont montré une présence du gène *cnf1* et *afa* à un taux de 25%et 35% respectivement, ces faibles proportions pourraient être la conséquence que le gène *cnf1* est l'un des déterminants de virulence les plus répandus et presque exclusivement fermés au phylogroupe B2 d'E. *coli* qui comprend E. coli pathogène extra-intestinal (ExPEC) (Alhadidi et al. 2022) et il est exprimé avec une prévalence plus élevée dans les souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC) que dans les autres *E. coli* pathogènes (Landraud et al. 2003), aussi pour le gène *afa* qui code pour la protéine caractéristique des souches uropathogènes (Aleksandrowicz et al. 2021). Ces résultats diffèrent de l'étude menée par (Mandana Lotfi, Hassan Momtaz 2021) en Iran, qui a révélé un taux de présence élevé de 61,6% pour ces gènes, par contre, une autre étude dans le même pays réalisée par (Derakhshan et al. 2019) a montré un taux de 28,57% pour les deux gènes.

Le gène *ompt* qui code pour une protéine extra membranaire était détecté chez toutes les souches d'EHEC analysées et le gène *iroN* était détecté chez 45 % des souches.

Le gène *ipr2* était absent dans les 20 souches analysées, alors que , une étude en Allemagne a rapporté que seulement 1 souche d'EHEC provenant de veau en suisse possède le gène *ipr2* (Ewers et al. 2005).

La distribution des gènes de virulence et de résistance au sein des souches d'EHEC étudiées révèle une diversité génétique importante. Les souches ont été regroupées en 13 clades différents en fonction des gènes de virulence, ce qui suggère une grande variabilité génétique. En revanche, pour les gènes de résistance, les souches ont été regroupées en 7 clades avec un seul clade dominant et les six autres considérés comme émergents, indiquant une diversité relativement moins prononcée. Cette diversité pourrait être due aux mutations et la sélection naturelle, qui contribuent à la formation de variations génétiques au sein de la population bactérienne. En résumé, la diversité génétique des souches d'EHEC étudiées est principalement attribuable aux gènes de virulence, ce qui suggère une variabilité dans les sources d'infection et de virulence de ces souches.

En comparant les résultats phénotypiques et génotypiques, on trouve que la majorité des souches possédant le gène TEM sont résistantes à l'Ampicilline a l'exception de certaines

souches qui présentent une résistance envers l'Ampicilline, Céfazoline et Amoxicilline/Acide clavulanique bien que le gène *TEM* est absent, cela pourrait être expliqué par la capacité des bactéries Gram-négative de développer des mutations au niveau des protéines de la membrane externe, telles que les porines. Ces mutations leur permettent d'éviter l'un des mécanismes de passage de l'antibiotique à travers la membrane externe, ce qui empêche l'antibiotique d'atteindre le site actif (PBP). Par ailleurs, les bactéries peuvent produire des pompes à efflux qui sont capables d'éliminer les antibiotiques du périplasme et de les transporter hors des cellules bactériennes. Ainsi, ces mécanismes combinés contribuent à la résistance des bactéries Gram-négatives envers les antibiotiques (Pimenta, Fernandes, and Moreira 2020). De plus, la possibilité de présence du gène SHV responsable aussi de la résistance à l'Ampicilline (Jubeh, Breijyeh, and Karaman 2020) pourrait être à l'origine de cette incohérence. La sensibilité de certaines souches vis-à-vis l'Ampicilline alors que le gène *TEM* est présent pourrait être due à des mutations dans ce gène.

En outre, la sensibilité envers l'Amoxicilline/acide clavulanique est due à l'inhibition des beta-lactamases codés par le gène *TEM* par l'Acide clavulanique. Cependant, il est important de noter que le gène *TEM* code pour une enzyme de type *TEM* capable d'hydrolysée les pénicillines et les céphalosporines de 1ère génération, mais en cas des mutations ce gène confère une résistance envers les céphalosporines de 3ème génération (Jubeh et al. 2020), ce qui explique la résistance de certaines souches étudiées vis-à-vis les céphalosporines de 3ème génération (céfotaxime et céftazidine).

D'après les résultats génotypiques et phénotypiques, on observe une incohérence entre ces deux résultats du fait que certaines souches qui ne possèdent pas le gène *qnr* ont présentées une résistance vis-à-vis l'Acide nalidixique. Cette incohérence pourrait être expliqué du fait que la résistance aux quinolones résulte généralement de mutations chromosomiques (Wang, Tran, et al. 2006) ou bien l'utilisation d'autres mécanismes de résistance tels que des modifications des gènes de l'ADN gyrase (*gyrA*) et/ou de la topoisomérase IV (*parC*), ou une diminution de la concentration intracellulaire due à l'imperméabilité de la membrane ou à la surexpression des systèmes de pompe à efflux (Pakzad et al. 2011).

Conclusion générale

Escherichia coli entérohémorragique (EHEC) est une souche pathogène d'*Escherichia coli* responsable de nombreuses infections gastro-intestinales dans le monde entier. Les infections à EHEC représentent un problème de santé publique majeur en raison de leur capacité à causer des symptômes sévères et des complications potentiellement mortelles.

Les résultats de notre étude permettent de fournir quelques données sur le profil de résistance d'EHEC ainsi que les souches circulantes dans la région de Médéa en termes des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. Ces résultats ont montré que l'infection par *Escherichia coli* entérohémorragique présente une prévalence plus élevée chez les femmes, environ 70% des cas. Une différence significative de résistance a été observée chez les souches d'EHEC vis-à-vis des antibiotiques de la famille des béta-lactamines, allant de 10% à 95%. Cependant, une faible résistance a été constatée envers des antibiotiques autres que les bêta-lactamines tels que la gentamycine, l'azithromycine et l'Acide nalidixique variant de 10% à 25%.

L'analyse moléculaire des gènes de résistance a révélé des taux élevés de présence des gènes *TEM, cmlA, tet(A) et dfrA1*, variant entre 65% et 85%. En ce qui concerne les gènes de virulence, certains présentaient des taux de présence faibles à modérés, tels que *eae*^{c}*, cnf1, afa, iroN et stx1*^{a}, variant entre 10% et 45% contrairement au gène *ompT* qui un taux de 100%.

Cette diversité génétique a permis de classifier les souches d'EHEC étudiées en 17 clades distincts, démontrant la variabilité au niveau moléculaire de ces souches.

La caractérisation moléculaire des souches d'EHEC isolées à partir de prélèvements cliniques offre des informations cruciales sur leur diversité génétique, leurs profils de virulence et leur résistance aux antibiotiques. Des études futures devraient se concentrer sur l'évaluation des facteurs de virulence en se concentrant sur des gènes spécifiques de virulence ce qui permet à identifier les souches les plus pathogènes et à mieux prédire les complications potentielles telles que le syndrome hémolytique et urémique. De plus, l'analyse de la résistance aux antibiotiques dans les souches EHEC permettrait de mieux comprendre l'évolution de la résistance et d'identifier de nouveaux marqueurs de résistance émergents. Cela contribuerait à guider les stratégies de traitement et à lutter contre la propagation de la résistance aux antibiotiques. La surveillance épidémiologique continue à long terme des souches d'EHEC isolées à partir de prélèvements cliniques est essentielle pour détecter rapidement les changements dans la diversité génétique et les profils de virulence. Cela permettrait de prévenir les épidémies et de mettre en place des mesures de prévention efficaces.

Références bibliographiques

Ahrberg, Christian D., Andreas Manz, and Bong Geun Chung. 2016. "Polymerase Chain Reaction in Microfluidic Devices." *Lab on a Chip* 16(20):3866–84. doi: 10.1039/c6lc00984k.

Aleksandrowicz, Adrianna, Muhammad Moman, Katarzyna Sidorczuk, and Mateusz Noszka. 2021. "Whatever Makes Them Stick – Adhesins of Avian Pathogenic Escherichia Coli." 257(April). doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109095.

Alhadidi, Hiba A. S., Safaa A. S. Al-Qaysi, and Mohammad M. F. Al-Halbosiy. 2022. "Prevalence and Cytotoxic Effects of Some Colibactin and Cnf Genes among Escherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infections." *Microbiology and Biotechnology Letters* 50(2):283–92. doi: 10.48022/mbl.2203.03005.

Alonso, Silvia, Azucena Mora, Miguel Blanco, Jesús E. Blanco, Ghizlane Dahbi, María T. Ferreiro, Cecilia López, Leonardo Alberghini, Sabrina Albonetti, Aurora Echeita, Marcello Trevisani, and Jorge Blanco. 2007. "Fecal Carriage of Escherichia Coli O157:H7 and Carcass Contamination in Cattle at Slaughter in Northern Italy." *International Microbiology* 10(2):109–16. doi: 10.2436/20.1501.01.16.

Anon. 2023. "How To Make 10% SDS Stock Solution." Retrieved June 5, 2023 (https://toptipbio.com/10-sds-stock-recipe/).

Ashmony, Ahmed, Alaa Mostafa, and Reda Tarabees. 2022. "Molecular Characterization of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes of E. Coli Isolated from Different Animal Sources." *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 74(2):6. doi: 10.5455/ajvs.75056.

Bardiau M., Mainil J. 2005. "Identification, Par Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) et Par Microarray, de Facteurs de Virulence Impliqués Dans L'attachement Initial et Dans La Spécificité D'hôte de Souches Entérohémorragiques." 11(2004):4276.

Barka, Mohammed Salih, and Kihal Mebrouk. 2014. "Prevalence and Characterization of Virulence Genes Toxin-Producing Escherichia Coli Enterohemorragic 0157 : H7 Strain Isolated from Frozen Imported Bovine Meat in Algeria Genetic Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Strains Isolated ." (May 2016).

BENKORTB, NOUHA, and YOUSRA BENBRIH. 2022. "Identification et Caractérisation D ' Esherichia . Coli Isolée Des Infections Urinaires Communautaires Dans La Région de Médéa Remerciements de L ' U Niversité Yahia Farés Médéa ." UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA.

Berger, Michael, Iqbal Aijaz, Petya Berger, Ulrich Dobrindt, and Gerald Koudelka. 2019. "Transcriptional and Translational Inhibitors Block SOS Response and Shiga Toxin Expression in Enterohemorrhagic Escherichia Coli." 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-55332-2.

Bhanothu, Venkanna, and Vijayalakshmi Venkatesan. 2019. "Conventional Polymerase Chain Reaction and Amplification Refractory Mutation System-Multi-Gene/ Multi-Primer PCR in the Diagnosis of Female Genital Tuberculosis." *Archives of Microbiology* 201(3):267–81. doi: 10.1007/s00203-019-01631-1.

Bibbal, Delphine, Philippe Ruiz, Panagiotis Sapountzis, Christine Mazuy-Cruchaudet, Estelle Loukiadis, Frédéric Auvray, Evelyne Forano, and Hubert Brugère. 2022. "Persistent Circulation of Enterohemorrhagic Escherichia Coli (EHEC) O157:H7 in Cattle Farms: Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia Coli O157:H7 Strains and Fecal Microbial Communities of Bovine Shedders and Non-Shedders." *Frontiers in Veterinary Science* 9(March):1–13. doi: 10.3389/fvets.2022.852475.

Bielaszewska, Martina, Alexander Mellmann, Stefan Bletz, Wenlan Zhang, Robin Köck, Annelene Kossow, Rita Prager, Angelika Fruth, Dorothea Orth-Höller, Monika Marejková, Stefano Morabito, Alfredo Caprioli, Denis Piérard, Geraldine Smith, Claire Jenkins, Katarína Čurová, and Helge Karch. 2013. "Enterohemorrhagic Escherichia Coli O26:H11/H-: A New Virulent Clone Emerges in Europe." *Clinical Infectious Diseases* 56(10):1373–81. doi: 10.1093/cid/cit055.

Blanco, M., J. E. Blanco, A. Mora, G. Dahbi, M. P. Alonso, E. A. González, M. I. Bernárdez, and J. Blanco. 2004. "Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia Coli Isolates from Cattle in Spain and Identification of A New Intimin Variant Gene (Eae-ξ)." *Journal of Clinical Microbiology* 42(2):645–51. doi: 10.1128/JCM.42.2.645-651.2004.

Blanco, Miguel, Nora L. Padola, Alejandra Krüger, Marcelo E. Sanz, Jesús E. Blanco, Enrique A. González, Ghizlane Dahbi, Azucena Mora, María Isabel Bernárdez, Analía I. Etcheverría, Guillermo H. Arroyo, Paula M. A. Lucchesi, Alberto E. Parma, and Jorge Blanco. 2004. "Virulence Genes and Intimin Types of Shiga-Toxin-Producing Escherichia Coli Isolated from Cattle and Beef Products in Argentina." *International Microbiology* 7(4):269–76.

Blount, Zachary D. 2015. “The Unexhausted Potential of E. Coli.” *eLife* 4:1–12. doi: 10.7554/eLife.05826.

Boisen, Nadia, Mark T. Østerlund, Katrine G. Joensen, Araceli E. Santiago, Inacio Mandomando, Alejandro Cravioto, Marie A. Chattaway, Laura A. Gonyar, Søren Overballe-Petersen, O.Colin Stine, David A. Rasko, Flemming Scheutz, and James P. Nataro. 2020. “Redefining Enteroaggregative Escherichia Coli (Eaec): Genomic Characterization of Epidemiological Eaec Strains.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(9):1–19. doi: 10.1371/journal.pntd.0008613.

Bolard, Arnaud. 2019. “Impliquées Dans La Résistance Non Enzymatique Aux Aminosides Chez Pseudomonas Aeruginosa To Cite This Version : HAL Id : Tel-02399228 Identification of Novel Regulatory Pathways Involved in Non-Enzymatic Resistance to Aminoglycosides in Pseudomonas Aerugi.”

Bonanno, Ludivine. 2016. “Rôle Des Phages Stx Dans La Diversité Des Souches d’Escherichia Coli Producteurs de Shiga-Toxine (STEC) O26 : H11 Isolées de Produits Alimentaires : Étude Du Polymorphisme et de La Mobilité Des Gènes Stx.”

Le Bouguénec, Chantal, and Alain L. Servin. 2006. “Diffusely Adherent Escherichia Coli Strains Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Hitherto Unrecognized Pathogens.” *FEMS Microbiology Letters* 256(2):185–94. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00144.x.

Bouvier. 2011. “Mise Au Point de Méthodes de Détection Des Souches D ’ Escherichia Coli Productrices de Shiga-Toxines (STEC).”

BOUVIER, Marion. 2011. “Mise Au Point de Méthodes de Détection Des Souches D ’ Escherichia Coli Productrices de Shiga-Toxines (STEC).”

Brugère, Hubert, Frédéric Auvray, Patricia Mariani-Kurkdjian, Lisa King A., and Estelle Loukiadis. 2012. “E. Coli Producteurs de Shigatoxines (STEC) Definition Virulence Propriété Des Souche Entérohemorragiques EHEC.” *Bulletin Épidémiologique, Santé Animale et Alimentation* 50(3):23–29.

Bush, Natassja G., Isabel Diez-santos, Lauren R. Abbott, and Anthony Maxwell. 2020. “Contributions to Antibiotic Resistance.”

Castanheira, Mariana, Patricia J. Simner, and Patricia A. Bradford. 2021. “Extended-

Spectrum β-Lactamases: An Update on Their Characteristics, Epidemiology and Detection." *JAC-Antimicrobial Resistance* 3(3). doi: 10.1093/jacamr/dlab092.

Castanheira, Mariana, Patricia J. Simner, Patricia A. Bradford, ., ., and . 2021. "Extended-Spectrum β-Lactamases: An Update on Their Characteristics, Epidemiology and Detection." *JAC-Antimicrobial Resistance* 3(3). doi: 10.1093/jacamr/dlab092.

Coburn, Bryan, Inna Sekirov, and B.Brett Finlay. 2007. "Type III Secretion Systems and Disease." *Clinical Microbiology Reviews* 20(4):535–49. doi: 10.1128/CMR.00013-07.

Dairawan, Mariyam, and Shetty Preetha J. 2020. "The Evolution of DNA Extraction Methods." *American Journal of Biomedical Science & Research* 8(1):39–45. doi: 10.34297/ajbsr.2020.08.001234.

DEBAB, Karima, and Habiba MADASSE. 2020. "Identification de Mutations Ponctuelles Dans Des Gènes Par L ' Approche PCR - Électrophorèse." UNIVERSITE DE M'SILA.

Derakhshan, Safoura, Fariba Farhadifar, Daem Roshani, Amjad Ahmadi, and Fakhri Haghi. 2019. "Study on the Presence of Resistant Diarrheagenic Pathotypes in Escherichia Coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infection." *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 12(4):348–57. doi: 10.22037/ghfbb.v12i4.1690.

Des, Universite, Sciences Des, Techniques Et, D. E. S. Technologies, D. E. Bamako, and Faculte D. E. Pharmacie. 2020. "Phénotypes de Résistance Aux Bêta-Lactamines Des Souches D'entérobactéries Isolées de Pus, D'hémoculture et de Selles Au CHU Du Point G."

Dinos, George P., Constantinos M. Athanassopoulos, Dionissia A. Missiri, Panagiota C. Giannopoulou, Ioannis A. Vlachogiannis, Georgios E. Papadopoulos, Dionissios Papaioannou, and Dimitrios L. Kalpaxis. 2016. "Chloramphenicol Derivatives as Antibacterial and Anticancer Agents: Historic Problems and Current Solutions." *Antibiotics* 5(2). doi: 10.3390/antibiotics5020020.

Domaine, Master, Vie Fili, Sciences Biologiques Sp, and Biologie Mol. 2020. "Dédicaces."

E. Rahimi. 2012. "Isolation and Genomic Characterization of Escherichia Coli O157:NM and Escherichia Coli O157:H7 in Minced Meat and Some Traditional Dairy Products in Iran." *African Journal of Biotechnology* 11(9):2328–32. doi: 10.5897/ajb11.2167.

Ebimieowei Etebu, Ibemologi Arikekpar. 2016. "Antibiotics: Classification and Mechanisms

of Action with." *Circulation* 96(2):90–101.

Elafify, Mahmoud, Basma Badawy, Mohamed Ahmed, Radwa Shata, Marwa Toukhy, and Mayada Gwida. 2022. "Genetic Characterization of Pathogenic Escherichia Coli Isolated from Smallholding Dairy Buffaloes, Their Products, and Some Environmental Sources." *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 74(1):31. doi: 10.5455/ajvs.7695.

Elizabeth A. Cameron, Vanessa Sperandio, Gary M.Dunny. 2020. "Enterococcus Faecalis." *Definitions*. doi: 10.32388/9nzrjp.

Eshetu Shumi Gebisa, Minda Asfaw Gerasu, Diriba Taddese Leggese. 2019. "A Review on Virulence Factors of Escherichia Coli." *Animal and Veterinary Sciences* 7(3):83. doi: 10.11648/j.avs.20190703.13.

Ewers, Christa, Traute Janßen, Sabine Kießling, Hans C. Philipp, and Lothar H. Wieler. 2005. "Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic Escherichia Coli by Multiplex Polymerase Chain Reaction." *Avian Diseases* 49(2):269–73. doi: 10.1637/7293-102604R.

Ezhvin, BELLEC. 2017. "DEVELOPPEMENT D ' UN M ODELE POUR COMPRENDRE ET MAITRISER LE PORTAGE."

Fabbri, Alessia, and Bracci. 2022. "Immunomodulatory Properties of CNF1 Toxin from E. Coli: Implications for Colorectal Carcinogenesis." *Am J Cancer Res.* 12(2):651–660.

Farajzadeh-Sheikh, Ahmad, Mohammad Savari, Khadijeh Ahmadi, Hossein Hosseini Nave, Mojtaba Shahin, and Maryam Afzali. 2020. "Distribution of Genes Encoding Virulence Factors and the Genetic Diversity of Enteroinvasive Escherichia Coli (Eiec) Isolates from Patients with Diarrhea in Ahvaz, Iran." *Infection and Drug Resistance* 13:119–27. doi: 10.2147/IDR.S235009.

Fili, Vie, and Khalfoune Asma Devant. 1945. "Remerciements."

Gadou, Victoire, Victoire Gadou, Epidemiologie Moleculaire, D. E. S. Enterobacteries, C. E. S. De, Lactamases A. Spectre, Elargi Resistantes, A. U. X. Aminosides, and E. T. Aux. 2019. "AUX AMINOSIDES ET AUX FLUOROQUINOLONES To Cite This Version :"

Gambushe, Sydney M., Oliver T. Zishiri, and Mohamed E. El Zowalaty. 2022. "Review of Escherichia Coli O157:H7 Prevalence, Pathogenicity, Heavy Metal and Antimicrobial Resistance, African Perspective." *Infection and Drug Resistance* 15:4645–73. doi:

10.2147/IDR.S365269.

Germovsek, Eva, Charlotte I. Barker, and Mike Sharland. 2017. "What Do I Need to Know about Aminoglycoside Antibiotics?" *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition* 102(2):89–93. doi: 10.1136/archdischild-2015-309069.

Ghafourian, Sobhan, Nourkhoda Sadeghifard, Sara Soheili, Zamberi Sekawi, ., ., ., and . 2014. "Extended Spectrum Beta-Lactamases: Definition, Classification and Epidemiology." *Current Issues in Molecular Biology* 17(1):11–22. doi: 10.21775/cimb.017.011.

Gouali, Malika, François-xavier Weill, Malika Gouali, and François-xavier Weill Enterohemorragic. 2019. "Enterohemorragic Escherichia Coli (EHEC): Topical Enterobacteriaceae To Cite This Version : HAL Id : Pasteur-02048153."

Govindarajan, Deenadayalan Karaiyagowder, Nandhini Viswalingam, Yogesan Meganathan, and Kumaravel Kandaswamy. 2020. "Adherence Patterns of Escherichia Coli in the Intestine and Its Role in Pathogenesis." *Medicine in Microecology* 5(October):100025. doi: 10.1016/j.medmic.2020.100025.

Gupta, Surbhi, Parveen Kumar, Bhawna Rathi, Vivek Verma, Rakesh Singh Dhanda, Pooja Devi, and Manisha Yadav. 2021. "Targeting of Uropathogenic Escherichia Coli papG Gene Using CRISPR-Dot Nanocomplex Reduced Virulence of UPEC." *Scientific Reports* 11(1):1–14. doi: 10.1038/s41598-021-97224-4.

He, Fanglian. 2011. *E. Coli Genomic DNA Extraction*. Vol. 1.

He, Xiao Long, Qin Wang, Liang Peng, Ya Rong Qu, Santhosh Puthiyakunnon, Xiao Lu Liu, Chang Ye Hui, Swapna Boddu, Hong Cao, and Sheng He Huang. 2015. "Role of Uropathogenic Escherichia Coli Outer Membrane Protein T in Pathogenesis of Urinary Tract Infection." *Pathogens and Disease* 73(3):1–9. doi: 10.1093/femspd/ftv006.

Hillen, Wolfgang, and Christian Berens. 1994. "EXPRESSION OF TNIO Wolfgang Hillen and Christian Berens." *Annual Review of Microbiology* 48:345–69.

Houda, HASSAINE, and BOULANOIR Meriem. 2019. "Resistance Aux Antibiotiques E. Coli." UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA FACULTE.

Hu, Jingjing, Lei Yang, Xuejing Cheng, Yiwen Li, and Yiyun Cheng. 2021. "Aminoglycoside-Based Biomaterials: From Material Design to Antibacterial and Gene Delivery Applications." *Advanced Functional Materials* 31(36):1–17. doi:

10.1002/adfm.202103718.

Hua, Ying, Xiangning Bai, Ji Zhang, Cecilia Jernberg, Milan Chromek, Sverker Hansson, Anne Frykman, Xi Yang, Yanwen Xiong, Chengsong Wan, and Andreas Matussek. 2020. "Molecular Characteristics of Eae-Positive Clinical Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Sweden." *Emerging Microbes and Infections* 9(1):2562–70. doi: 10.1080/22221751.2020.1850182.

Hui, Chang Ye, Yan Guo, Qui Shan He, Liang Peng, Shu Chi Wu, Hong Cao, and Sheng He Huang. 2010. "Escherichia Coli Outer Membrane Protease OmpT Confers Resistance to Urinary Cationic Peptides." *Microbiology and Immunology* 54(8):452–59. doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x.

Ibrahim, Munir, Usman Zango, Sadiq Abdurrahman Shawai, and Ibrahim Shamsuddin. 2019. "A Review on Beta-Lactam Antibiotic Drug Resistance." *Drug Design, Development and Therapy* 3(April):52–58. doi: 10.15406/mojddt.2019.03.00080.

Jafari Ozumchelouei, Elnaz, Amir Hossein Hamidian, Yu Zhang, and Min Yang. 2020. "Physicochemical Properties of Antibiotics: A Review with an Emphasis on Detection in the Aquatic Environment." *Water Environment Research* 92(2):177–88. doi: 10.1002/wer.1237.

Jehl, F., A. Chabaud, and A. Grillon. 2015. "L'antibiogramme : Diamètres Ou CMI ?" *Journal Des Anti-Infectieux* 17(4):125–39. doi: 10.1016/j.antinf.2015.08.003.

Jeong, Jin Yong, Hyun Jung Yoon, Eun Sil Kim, Yoola Lee, Sang Ho Choi, Nam Joong Kim, Jun Hee Woo, and Yang Soo Kim. 2005. "Detection of Qnr in Clinical Isolates of Escherichia Coli from Korea." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6):2522–24. doi: 10.1128/AAC.49.6.2522-2524.2005.

Jiang, Meiyan, Takatoshi Karasawa, and Peter S. Steyger. 2017. "Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11(October):1–14. doi: 10.3389/fncel.2017.00308.

Jubeh, Buthaina, Zeinab Breijyeh, and Rafik Karaman. 2020. "Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches." *Molecules* 25(12). doi: 10.3390/molecules25122888.

Julie-Hélène. 2014. "Mammite Bovine À Escherichia Coli ; Identification et Caractérisation

de La Persistance Mammite Bovine À Escherichia Coli ; Identification et Caractérisation de La Persistance." 1–128.

Kalin, Recep, and Hasan Öngör. 2014. "Examination of Escherichia Coli O157:H7 and Some Virulence Genes in Marketed Minced Meat Samples." *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 20(6):957–60. doi: 10.9775/kvfd.2014.11310.

Kalin, Recep, Hasan Ongor, and Burhan Cetinkaya. 2012. "Isolation and Molecular Characterization of Escherichia Coli O157 from Broiler and Human Samples." *Foodborne Pathogens and Disease* 9(4):313–18. doi: 10.1089/fpd.2011.0991.

Karimpour, Mehdi, Vadood Razavilar, Nordahr , Rokni, and Mohammad Ahmadi. 2019. "Egyptian Journal of Veterinary Sciences." 51(1):43–54. doi: 10.21608/ejvs.2019.17122.1098.

Kathayat, Dipak, Dhanashree Lokesh, Sochina Ranjit, and Gireesh Rajashekara. 2021. "Avian Pathogenic Escherichia Coli (Apec): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies." *Pathogens* 10(4):1–32. doi: 10.3390/pathogens10040467.

Khanifar, Jaleh, Reza Haji Hosseini, Rouhoallah Kazemi, Mahdi Fasihi Ramandi, Jafar Amani, and Ali Hatef Salmanian. 2019. "Prevention of EHEC Infection by Chitosan Nano-Structure Coupled with Synthetic Recombinant Antigen." *Journal of Microbiological Methods* 157(January):100–107. doi: 10.1016/j.mimet.2019.01.002.

Kobayashi, Hideki, Akihiko Miura, Hiroko Hayashi, Torata Ogawa, Takayuki Endô, Eiji Hata, Masashi Eguchi, and Kôsi Yamamoto. 2003. "Prevalence and Characteristics of Eae-Positive Escherichia Coli from Healthy Cattle in Japan." *Applied and Environmental Microbiology* 69(9):5690–92. doi: 10.1128/AEM.69.9.5690-5692.2003.

Koitabashi, Tsutomu, Varaporn Vuddhakul, Son Radu, Tadaaki Morigaki, Norio Asai, Yoshitsugu Nakaguchi, and Mitsuaki Nishibuchi. 2006. "Genetic Characterization of Escherichia Coli O157 : H7 / ⁒Strains Carrying the Stx 2 Gene but Not Producing Shiga Toxin 2." 50(2):135–48.

Konaré, S. 2016. "Sensibilité Aux Antibiotiques Des Souches d'Entérobactéries Isolées En 2016 Au Laboratoire de Biologie Médicale et Hygiène Hospitalière Du CHU Du Point G [Thèse]." *Bamako.: Université Des Sciences Des Techniques et Des Technologies de Bamako*.

Koutsoumanis, Konstantinos, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, Robert Davies, Alessandra De Cesare, Lieve Herman, Friederike Hilbert, Roland Lindqvist, Maarten Nauta, Giuseppe Ru, Marion Simmons, Panagiotis Skandamis, Elisabetta Suffredini, Dan I. Andersson, Vasileios Bampidis, Johan Bengtsson-Palme, Damien Bouchard, Aude Ferran, Maryline Kouba, Secundino López Puente, Marta López-Alonso, Søren Saxmose Nielsen, Alena Pechová, Mariana Petkova, Sebastien Girault, Alessandro Broglia, Beatriz Guerra, Matteo Lorenzo Innocenti, Ernesto Liébana, Gloria López-Gálvez, Paola Manini, Pietro Stella, and Luisa Peixe. 2021. "Maximum Levels of Cross-Contamination for 24 Antimicrobial Active Substances in Non-Target Feed. Part 13: Diaminopyrimidines: Trimethoprim." *EFSA Journal* 19(10). doi: 10.2903/j.efsa.2021.6865.

LADJAL, Salima, and Amira BAGHDADI. 2021. "Remerciements."

Landraud, Luce, Maryse Gibert, Michel R. Popoff, Patrice Boquet, and Michel Gauthier. 2003. "Expression of cnf1 by Escherichia Coli J96 Involves a Large Upstream DNA Region Including the hlyCABD Operon, and Is Regulated by the RfaH Protein." *Molecular Microbiology* 47(6):1653–67. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03391.x.

Lemaignen, Adrien, Christophe Ridel, Alexandre Hertig, and Eric Rondeau. 2013. "Escherichia Coli Associated Hemolytic and Uremic Syndrome: What Lessons Can Be Learned after the European Epidemic of 2011?" *Nephrologie et Therapeutique* 9(3):129–36. doi: 10.1016/j.nephro.2012.10.011.

Liesel J. Schneider. 2017. "Escherichia Coli :" 0(December).

Lima, Lidia Moreira, Bianca Nascimento, Gisele Barbosa, and J. Eliezer. 2020. "L P Re Pr Na." *European Journal of Medicinal Chemistry* 112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829.

Lima, Lidia Moreira, Bianca Nascimento Monteiro da Silva, Gisele Barbosa, and Eliezer J. Barreiro. 2020. "β-Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective." *European Journal of Medicinal Chemistry* 208:112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829.

Lombardo, Michael N., Narendran G-Dayanandan, Dennis L. Wright, and Amy C. Anderson. 2016. "Crystal Structures of Trimethoprim-Resistant DfrA1 Rationalize Potent Inhibition by Propargyl-Linked Antifolates." *ACS Infectious Diseases* 2(2):149–56. doi:

10.1021/acsinfecdis.5b00129.

Loukiadis, Estelle, Hélène Callon, Christine Mazuy-cruchaudet, Valérie Vallet, and Christine Bidaud. 2012. “Dans Les Denrées Alimentaires En France (2005-2011) Contexte Sanitaire National Contexte Réglementaire :” 2010(1):3–9.

MacWilliams, Maria P., and Min-Ken Liao. 2016. “Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol.” *American Society for Microbiology* (October 2006):1–4.

Maiga, Professeur Ibrahim. 2006. “FREQUENCE D ’ ISOLEMENT DES SOUCHES D ’ Escherichia Coli AU LABORATOIRE DE L ’ HGT DE FEVRIER 2002 A DECEMBRE 2004 FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D ’ ODONTO-.”

Mandana Lotfi, Hassan Momtaz, Elahe Tajbakhsh. 2021. “VIRULENCE FACTOR PROFILE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF Escherichia Coli O157 STRAINS ISOLATED FROM ANIMAL RAW MEAT.” *Minnesota Medicine* 30(5):512. doi: 10.4324/9781315828428-234.

Mashak, Zohreh. 2018. “Prevalence and Antibiotic Resistance of *Escherichia Coli* O157:H7 Isolated from Raw Meat Samples of Ruminants and Poultry.” *Journal of Food and Nutrition Research* 6(2):96–102. doi: 10.12691/jfnr-6-2-5.

Melton-celsa, Angela R. 2014. “Shiga Toxin (Stx) Classi Fi Cation , Structure , and Function.” doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.Correspondence.

Michèle, Maryse. 2016. *1Sïtfouïf Fu Tpvufovf Qbs*.

Millanao, Ana R., Aracely Y. Mora, A. Villagra, Sergio A. Bucarey, and Alejandro A. Hidalgo. 2021. *Biological Effects of Quinolones : A Family of Broad-Spectrum Antimicrobial Agents*.

Mohammedi. 2012. “Classification et Mode D’action Des Antibiotiques.” 1–10.

Momtaz, Hassan, Rahil Farzan, Ebrahim Rahimi, Farhad Safarpoor Dehkordi, and Negar Souod. 2012. “Molecular Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Isolated from Ruminant and Donkey Raw Milk Samples and Traditional Dairy Products in Iran.” *The Scientific World Journal* 2012. doi: 10.1100/2012/231342.

Momtaz, Hassan, and Alireza Jamshidi. 2012. “Momtaz 2012.pdf.” 1.

Momtaz, Hassan, Farhad Safarpoor Dehkordi, Taghi Taktaz, Amir Rezvani, and Sajad Yarali. 2012. "Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Isolated from Bovine Mastitic Milk: Serogroups, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance Properties." *The Scientific World Journal* 2012. doi: 10.1100/2012/618709.

Mora, Azucena, Jesús E. Blanco, Miguel Blanco, M.Pilar Alonso, Ghizlane Dhabi, Aurora Echeita, Enrique A. González, M.Isabel Bernárdez, and Jorge Blanco. 2005. "Antimicrobial Resistance of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia Coli O157:H7 and Non-O157 Strains Isolated from Humans, Cattle, Sheep and Food in Spain." *Research in Microbiology* 156(7):793–806. doi: 10.1016/j.resmic.2005.03.006.

Mora, Azucena, Miguel Blanco, Jesús E. Blanco, M.Pilar Alonso, Ghizlane Dhabi, Fiona Thomson-Carter, Miguel A. Usera, Rosa Bartolomé, Guillermo Prats, and Jorge Blanco. 2004. "Phage Types and Genotypes of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157:H7 Isolates from Humans and Animals in Spain: Identification and Characterization of Two Predominating Phage Types (PT2 and PT8)." *Journal of Clinical Microbiology* 42(9):4007–15. doi: 10.1128/JCM.42.9.4007-4015.2004.

Mora, Azucena, Miguel Blanco, Jesús E. Blanco, Ghizlane Dahbi, Cecilia López, Paula Justel, María Pilar Alonso, Aurora Echeita, María Isabel Bernárdez, Enrique A. González, and Jorge Blanco. 2007. "Serotypes, Virulence Genes and Intimin Types of Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing Escherichia Coli Isolates from Minced Beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003." *BMC Microbiology* 7. doi: 10.1186/1471-2180-7-13.

Mora, Azucena, Santana L. León, Miguel Blanco, Jesús E. Blanco, Cecilia López, Ghizlane Dahbi, Aurora Echeita, Enrique A. González, and Jorge Blanco. 2007. "Phage Types, Virulence Genes and PFGE Profiles of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157:H7 Isolated from Raw Beef, Soft Cheese and Vegetables in Lima (Peru)." *International Journal of Food Microbiology* 114(2):204–10. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.009.

Oluyege, A., and O. Famurewa. 2015. "Shiga Toxin and Non-Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157 from Cattle, Goats and Chickenin Ado-Ekiti, South West, Nigeria." *International Journal of TROPICAL DISEASE & Health* 6(4):108–18. doi: 10.9734/ijtdh/2015/7352.

Pakbin, Babak, Afshin Akhondzadeh Basti, Ali Khanjari, Leila Azimi, and Abdollah Karimi. 2020. "Differentiation of stx1A Gene for Detection of Escherichia Coli Serotype O157: H7 and Shigella Dysenteriae Type 1 in Food Samples Using High Resolution Melting Curve Analysis." *Food Science and Nutrition* 8(7):3665–72. doi: 10.1002/fsn3.1649.

Pakbin, Babak, Wolfram M. Brück, and John W. A. Rossen. 2021. "Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia Coli: A Review." *International Journal of Molecular Sciences* 22(18). doi: 10.3390/ijms22189922.

Pakzad, Iraj, Sohbhan Ghafourian, Morovat Taherikalani, Norkhoda Sadeghifard, Hamid Abtahi, Mohammad Rahbar, and Neda Mansory Jamshidi. 2011. "Qnr Prevalence in Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) and None- ESBLs Producing Escherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infections in Central of Iran." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 14(5):458–64.

Palzkill, Timothy. 2018. "Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β-Lactamases." *Frontiers in Molecular Biosciences* 5(FEB):1–19. doi: 10.3389/fmolb.2018.00016.

PATON, JAMES C.PATON* AND ADRIENNE W. 2008. "Pathogenesis and Treatment of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Infections." *Current Opinion in Gastroenterology* 24(1):38–47. doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f2dfb8.

Perewari, Doubra Otis, Kome Otokunefor, and Obakpororo Ejiro Agbagwa. 2022. "Tetracycline-Resistant Genes in Escherichia Coli from Clinical and Nonclinical Sources in Rivers State, Nigeria." *International Journal of Microbiology* 2022. doi: 10.1155/2022/9192424.

Pimenta, A. C., R. Fernandes, and I. S. Moreira. 2020. "Evolution of Drug R E S I S T a N c E : Insight on TEM β -Lactamases Structure and Activity and β-Lactam Antibiotics."

Rahimi, E., H. Momtaz, M.Mohammad Hosseini Anari, M. Alimoradi, and M. Momeni. 2012. "Isolation and Genomic Characterization of Escherichia Coli O157 : NM and Escherichia Coli O157 : H7 in Minced Meat and Some Traditional Dairy Products in Iran." 11(9):2328–32. doi: 10.5897/AJB11.2167.

Rani, Alka, Vivek B. Ravindran, Aravind Surapaneni, Nitin Mantri, and Andrew S. Ball. 2021. "International Journal of Food Microbiology Review : Trends in Point-of-Care

Diagnosis for Escherichia Coli O157 : H7 in Food and Water." *International Journal of Food Microbiology* 349(May):109233. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109233.

Rezazadeh, Maryam, Hamid Baghchesaraei, and Amir Peymani. 2016. "Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (Qnr) Genes in Clinical Isolates of Escherichia Coli Collected from Several Hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran." *Osong Public Health and Research Perspectives* 7(5):307–12. doi: 10.1016/j.phrp.2016.08.003.

Rodríguez-Rubio, Lorena, Nadja Haarmann, Maike Schwidder, Maite Muniesa, and Herbert Schmidt. 2021. "Bacteriophages of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli and Their Contribution to Pathogenicity." *Pathogens* 10(4):1–23. doi: 10.3390/pathogens10040404.

Rusu, Aura, and Emanuela Lorena Buta. 2021. "The Development of Third-Generation Tetracycline Antibiotics and New Perspectives." *Pharmaceutics* 13(12). doi: 10.3390/pharmaceutics13122085.

Rusu, Aura, Ioana Andreea Lungu, Octavia Laura Moldovan, Corneliu Tanase, and Gabriel Hancu. 2021. "Structural Characterization of the Millennial Antibacterial (Fluoro)quinolones—shaping the Fifth Generation." *Pharmaceutics* 13(8):1–37. doi: 10.3390/pharmaceutics13081289.

Salah, Fortune Djimabi, Soubeiga, Serge Theophile', Abdoul Karim Ouattara, Adodo Yao Sadji, Amana Metuor-Dabire, Dorcas Obiri-yeboah, Abiba Banla-kere, Simplice Karou, and Jacques Simpore. 2019. "Distribution of Quinolone Resistance Gene (Qnr) in ESBL-Producing Escherichia Coli and Klebsiella Spp. in Lomé , Togo." *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 8:1–8.

Salih, Barka Mohammed, Azzi Noureddine, Bendimerad Khatib, and Kihal Mebrouk. 2014. "Prevalence and Characterization of Virulence Genes Toxin-Producing Escherichia Coli Enterohemorragic 0157:H7 Strain Isolated from Frozen Imported Bovine Meat in Algeria." *Journal of Pure and Applied Microbiology* 8(2):1145–52.

Samiya, BOUZIDI Selma, ELBAH Sabrina, and FOUGHALI ATTI. 2020. "L ' Effet Des Hormones de Grossesse Sur La Flore Urénovaginale Chez Les Femmes Enceintes."

Sanchez-Villamil, Javier I., Daniel Tapia, and Alfredo G. Torres. 2019. "Development of a Gold Nanoparticle Vaccine against." 10(4):1–16.

SAVOYE, Fanny. 2011. “Optimisation Du Protocole de Recherche Des Escherichia Coli Producteurs de Shiga-Toxines (STEC) Dans Les Aliments Remerciements À … Messieurs et Mesdames Les Membres Du Jury :” 1–197.

Servin, Alain L. 2005. “Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia Coli.” *Clinical Microbiology Reviews* 18(2):264–92. doi: 10.1128/CMR.18.2.264-292.2005.

Shumi Gebisa, Eshetu. 2019. “A Review on Virulence Factors of <i>Escherichia Coli</i>” *Animal and Veterinary Sciences* 7(3):83. doi: 10.11648/j.avs.20190703.13.

Solomon, R. 2001. “Infections Urinoires Chez I ’ Enfant.” 6–12.

Soltani, Saber, Amir Emamie, Mahsa Dastranj, Abbas Farahani, Abolfazl Davoodabadi, and Parviz Mohajeri. 2018. “Role of Toxins of Uropathogenic Escherichia Coli in Development of Urinary Tract Infection.” *Journal of Pharmaceutical Research International* 21(1):1–11. doi: 10.9734/jpri/2018/39188.

Stéphanie VORKAUFER. 2011. “Ce Document Est Le Fruit D â€™ Un Long Travail Approuvé Par Le Jury de Soutenance et Mis À Disposition de L â€™ Ensemble de La Communauté Universitaire Élargie . Implique Une Obligation de Citation et de Référencement Lors de L ’ Utilisation de Ce Document .”

Tantillo, Elena, Antonella Colistra, Eleonora Vannini, Chiara Cerri, Laura Pancrazi, Laura Baroncelli, Mario Costa, and Matteo Caleo. 2018. “Bacterial Toxins and Targeted Brain Therapy: New Insights from Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1).” *International Journal of Molecular Sciences* 19(6):1–13. doi: 10.3390/ijms19061632.

Tarazi, Yaser H., Saeb N. El-Sukhon, Zuhair Bani Ismail, and Amani A. Almestarehieh. 2021. “Molecular Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia Coli Isolated from Diarrhea Samples from Human, Livestock, and Ground Beef in North Jordan.” *Veterinary World* 14(10):2827–32. doi: 10.14202/vetworld.2021.2827-2832.

Tevyashova, Anna N. 2021. “Recent Trends in Synthesis of Chloramphenicol New Derivatives.” *Antibiotics* 10(4):1–13. doi: 10.3390/antibiotics10040370.

Travaglione, Sara, Alessia Fabbri, and Carla Fiorentini. 2008. “The Rho-Activating CNF1 Toxin from Pathogenic E. Coli: A Risk Factor for Human Cancer Development?” *Infectious Agents and Cancer* 3(1):1–9. doi: 10.1186/1750-9378-3-4.

Tsoumtsa Meda, Landry L., Luce Landraud, Serena Petracchini, Stéphane Descorps-Declere, Emeline Perthame, Marie Anne Nahori, Laura Ramirez Finn, Molly A. Ingersoll, Rafael Patiño-Navarrete, Philippe Glaser, Richard Bonnet, Olivier Dussurget, Erick Denamur, Amel Mettouchi, and Emmanuel Lemichez. 2022. "The cnf1 Gene Is Associated with an Expanding Escherichia Coli ST131 H30Rx/C2 Subclade and Confers a Competitive Advantage for Gut Colonization." *Gut Microbes* 14(1). doi: 10.1080/19490976.2022.2121577.

Ur Rahman, Sadeeq, Tariq Ali, Ijaz Ali, Nazir Ahmad Khan, Bo Han, and Jian Gao. 2018. "The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases." *BioMed Research International* 2018. doi: 10.1155/2018/9519718.

Wale, Kabo R., Curtis Cottam, James PR Connolly, and Andrew J. Roe. 2021. "Transcriptional and Metabolic Regulation of EHEC and Citrobacter Rodentium Pathogenesis." *Current Opinion in Microbiology* 63:70–75. doi: 10.1016/j.mib.2021.06.002.

Wang, Ming Hsien, and Kwang Sik Kim. 2013. "Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Contributes to Escherichia Coli Meningitis." *Toxins* 5(11):2270–80. doi: 10.3390/toxins5112270.

Wang, Minggui, Daniel F. Sahm, George A. Jacoby, and David C. Hooper. 2006. "Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the qnrA Gene in Enterobacter Cloacae Clinical Isolates in China." *Journal of Hospital Infection* 63(3):349–50. doi: 10.1016/j.jhin.2006.02.013.

Wang, Minggui, John H. Tran, George A. Jacoby, Yingyuan Zhang, Fu Wang, and David C. Hoopner. 2006. "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of Escherichia Coli." *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy* 6(4):217–21. doi: 10.1128/AAC.47.7.2242.

Warr, Alyson R., Troy P. Hubbard, Diana Munera, Carlos J. Blondel, Pia Abel Zur Wiesch, Sören Abel, Xiaoxue Wang, Brigid M. Davis, and Matthew K. Waldor. 2019. *Transposon-Insertion Sequencing Screens Unveil Requirements for EHEC Growth and Intestinal Colonization*. Vol. 15.

Wijetunge, D. S. S., S. Gongati, C. Debroy, K. S. Kim, P. O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, and S. Kariyawasam. 2015. "Characterizing the Pathotype of Neonatal Meningitis Causing Escherichia Coli (NMEC) Applied Microbiology." *BMC*

Microbiology 15(1):1–15. doi: 10.1186/s12866-015-0547-9.

YALCOUYE, Elizabeth Yategué. 2020. "Prescription Des Antibiotiques Dans Le Service d'Accueil Des Urgences Du CHU Gabriel Touré." UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO Thèse.

Yandag, Munkhdelger, Altansukh Tsend-Ayush, Nyamaa Gunregjav, Otgontsetseg Erdenebayar, Bayarlakh Byambadorj, Nishi Juniichiro, and Sarantuya Jav. 2023. "Detection and Antibiotic Resistance of Diarrheagenic Escherichia Coli from Patients with Diarrhea in Ulaanbaatar, Mongolia." *The Journal of Infection in Developing Countries* 17(2):202–9. doi: 10.3855/jidc.17256.

Yang, Xi, Hui Sun, Ruyue Fan, Shanshan Fu, Ji Zhang, Andreas Matussek, Yanwen Xiong, and Xiangning Bai. 2020. "Genetic Diversity of the Intimin Gene (Eae) in Non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Strains in China." *Scientific Reports* 10(1):1–9. doi: 10.1038/s41598-020-60225-w.

Yano, Bungo, Itsuki Taniguchi, Yasuhiro Gotoh, Tetsuya Hayashi, and Keiji Nakamura. 2023. "Dynamic Changes in Shiga Toxin (Stx) 1 Transducing Phage throughout the Evolution of O26:H11 Stx-Producing Escherichia Coli." *Scientific Reports* 13(1):4935. doi: 10.1038/s41598-023-32111-8.

Younis, Gamal A., Rasha M. Elkenany, Mohamed A. Fouda, and Noura F. Mostafa. 2017. "Virulence and Extended-Spectrum β-Lactamase Encoding Genes in Escherichia Coli Recovered from Chicken Meat Intended for Hospitalized Human Consumption." 10:1281–85. doi: 10.14202/vetworld.2017.1281-1285.

Younis, Waleed, Sabry Hassan, and Hams M. A. Mohamed. 2021. "Molecular Characterization of Escherichia Coli Isolated from Milk Samples with Regard to Virulence Factors and Antibiotic Resistance." *Veterinary World* 14(9):2410–18. doi: 10.14202/vetworld.2021.2410-2418.