

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل
École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DU
MASTER**

Sujet :

**Phylogénie des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir
de la moule *Mytilus galloprovincialis* d'élevage et sauvage**

Réaliser par :

ZEBILA IMANE

Examiné par la commission

M^{me} CHAOU N.

Maître assistante A (ENSSMAL)

Président

M^{elle} ALOUACHE S.

Maître de conférences B (ENSSMAL)

Promotrice

M^{me} AMAR I.

Maître assistante A (ENSSMAL)

Examinatrice

M^{me} LARIBI H.

Maître assistante A (USTHB)

Examinatrice

Promotion 2013

REMERCIEMENTS

Je remercie DIEU de m'avoir aidé et donne le courage pour réaliser ce travail

Je tiens également à remercier au deux chère parent qui se sont sacrifié pour m'offrir un climat idéal du travail.

Mes remerciements s'adressent : Au Dr Alouache Souhila je vous remercie d'avoir assumé la responsabilité de m'encadrer de près.

Je suis très reconnaissante pour votre précieux conseils, votre compétences, votre savoir faire ; ainsi que votre sympathies, simplicités, modesties, disponibilités, gentillesse et passions pour réaliser ce travail, c'était une expérience enrichissante et je crois que votre passion pour le travail m'a contaminé.

Je vous exprimer mes gratitude et mes respectueux sentiments.

Ce travail a été réalisé en collaboration entre l'ENSSMAL et le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la faculté des Sciences biologiques de l'USTHB (Equipe de génétique). Il n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes auxquelles on tient à exprimer ici notre gratitude et notre reconnaissance.

Nos remerciements vont également à :

M^{me} Chaou N. maître assistante de classe A à l'ENSSMAL d'avoir acceptée de présider le jury.

M^{me} Amar I. maître assistante de classe A à l'ENSSMAL et M^{me} Lairibi H. maître de conférences B à Saad Dahlab d'avoir bien voulu examiner et corriger ce travail.

Nos remerciements s'adressent également aux Ingénieurs de l'ENSSMAL particulièrement Mme Refes N. et Mr Matouk Y.

Notre gratitude et reconnaissance s'expriment à toutes les personnes ayant contribué, chacune à sa manière, pour le bon déroulement de notre formation.

DEDICACES

Je dédie ce travail,

*A mon cher et regretté papa **HACHANI** qui est partie à jamais, tu as laissé un grand vide derrière toi tu nous manques tellement. Repose en paix*

Je t'aime je t'aime je t'aime papa

*A la plus brave des mamans **YAMINA Nouar Kharkhachi***

Nulle dédicace ne peut exprimer ce que je dois pour vos sacrifices et votre patience durant mes années d'études. Ce travail n'est qu'un humble témoignage de mon grand et éternel amour, de mon infinie reconnaissance et de mon attachement indéfectible.

Je t'aime je t'aime je t'aime vraiment maman.

Que Dieu préserve votre santé et vous accorde longue vie.

*À mon cher aimable **MOKHTAR** qui a été toujours présent pour moi pendant toutes ces années*

*A mes frères **Ala El-Dinne**, Hamza, Saïf et Laid.*

Mes soeurs surtout Somaia,

A mon oncle Amar et sa femme Malika.

Sommaire

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I	
I Généralités	2
I.1 Généralités sur la conchyliculture et la moule.....	2
I.1.1 Généralités sur la conchyliculture.....	2
I.1.2 Définition de la mytiliculture.....	2
I.1.3 La production mondiale.....	2
I.1.4 La mytiliculture en Algérie.....	3
I.2 Présentation de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	3
I.2.1 Systématique de la moule	3
I.2.2 Morphologie	4
I.2.3 Anatomie.....	5
I.2.4 Reproduction.....	6
I.2.5 Régime alimentaire.....	7
I.2.6 Les risques sanitaires liés à la consommation des coquillages.....	8
II Présentation d' <i>Escherichia coli</i>	9
II.1 Coliformes fécaux et <i>E.coli</i>	9
II.2 Taxonomie.....	9
II.3 Caractères cultureux d' <i>E.coli</i>	10
II.4 Caractères biochimiques.....	10
II.5 Le squelette génomique de l'espèce.....	12
II.6 Subdivisions de l'espèce <i>E. coli</i>	13
II.6.1 Classification des <i>E. coli</i> responsables des troubles intestinaux.....	14
II.7 Diversité des souches et pathogénicité.....	17
II.8 Phylogénie de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	18

II.9 La répartition d' <i>Escherichia coli</i> dans l'environnement.....	23
--	----

Chapitre II

II Matériel et Méthodes.....	25
II.1 Présentation du site.....	25
II.2 Présentation des souches.....	25
II.3 Méthodes.....	26
II.3.1 Identification biochimique par galerie API 20 E.....	26
II.3.2 Extraction de l'ADN.....	27
II.3.3 Détermination des groupes phylogénétiques par PCR	28
II.3.3.1. Principe de la PCR.....	28
II.3.3.2 Recherche des groupes phylogénétiques.....	29
II.3.3.3 Mélange réactionnel.....	29
II.3.3.4 Conditions de PCR.....	29
II.3.4. Electrophorèse.....	30

Chapitre III

III Résultats et discussion.....	31
III.1. Identification des souches <i>Escherichia coli</i>	31
III.2. Recherche des groupes phylogénétiques d' <i>E.coli</i>	32
III.2.1. Recherche du gène <i>ChuA</i>	33
III.2.2. Recherche du gène <i>yjaA</i>	33
III.2.3. Recherche du fragment <i>TSPE4.C2</i>	34
III.2.4. Détermination des groupes phylogénétique.....	35
III.3 Relation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques...	39
Conclusion.....	45
Références bibliographiques.....	46

La liste des figures

Figure 1: La conchyliculture mondiale.....	3
Figure 2: aspect extérieur de la moule.....	4
Figure 3: aspect intérieur de la moule.....	4
Figure 4: anatomie interne de la moule.....	6
Figure 5: Nutrition et respiration chez la moule.....	8
Figure 6: Observation microscopique de la ciliature péritriche d' <i>E. coli</i>	10
Figure 7: Caractéristiques générales d'un îlot génomique.....	13
Figure 8: Structure des antigènes.....	14
Figure 9: Pathogénie associée aux six classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées.....	16
Figure 10: Différents groupes d' <i>Escherichia coli</i> pathogènes.....	18
Figure 11: Arbre phylogénétique du groupe <i>E. coli</i>	19
Figure 12: Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches d' <i>E. coli</i> par amplification génique (PCR).....	20
Figure 13: illustration de la présence du gène <i>chuA</i> chez les souches d' <i>E. coli</i>	33
Figure 14: illustration de la présence du gène <i>yjaA</i> chez les souches d' <i>E. coli</i>	34
Figure 15: illustration de la présence du gène <i>TspE4.C2</i> chez les souches d' <i>E. coli</i>	35
Figure 16: Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches d' <i>E. coli</i> par amplification génique (PCR).....	35
Figure 17: La répartition des 24 souches d' <i>E. coli</i> selon leurs groupes phylogénétiques...37	
Figure 18: Les différents groupes phylogénétiques retrouvés chez les souches d' <i>E. coli</i> selon leur origine.....	38
Figure 19: Nombre de souches résistantes aux antibiotiques appartiennent au groupe A..40	
Figure 20: Nombre de souches résistantes aux antibiotiques appartiennent au groupe B1.41	
Figure 21: Le nombre de multi-résistances chez les groupes phylogénétiques.....	42

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractères biochimiques d' <i>E. coli</i>	11
Tableau 2: Profils d'antibio-résistance des 30 coliformes isolés à partir de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	26
Tableau 3: liste des amorces utilisées pour la détermination de la phylogénie d' <i>E.coli</i>	29
Tableau 4: identification des 24 souches d' <i>Escherichia coli</i> isolés à partir de moules d'élevages et de moules sauvages.....	32
Tableau 5: Résultat de la phylogénie des <i>E.coli</i> isolés à partir des moules d'élevages et sauvages.....	36
Tableau 6: Relation résistance aux antibiotiques-groupes phylogénétiques.....	42
Tableau 7: Tableau des souches avec les gènes présents.....	43

Introduction

Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) est un indicateur de pollution d'origine fécale humaine ou animale. Sa présence dans les eaux de consommation ou les aliments constitue un risque non négligeable pour la santé humaine. Ces bactéries, lorsqu'elles sont trop concentrées, peuvent poser des problèmes de santé aux consommateurs de produits de la mer contaminés tels que les bivalves.

L'identification d'un micro-organisme est fondée sur des critères subjectifs. Quelle que soit la qualité du travail réalisé et de la méthode d'identification utilisée. Il n'existe pas une classification unique. La reconnaissance des espèces par les procédés d'identification est basée sur les propriétés phylogéniques ou biochimiques de plusieurs souches jugées comme représentatives. En bactériologie clinique, les germes à identifier sont ceux qui présentent une importance pour l'homme.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la détermination des groupes phylogénétiques de l'espèce *Escherichia coli* qui est un hôte commun de la microflore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). La majorité des souches d'*E. coli* sont commensales, mais certaines ont toutefois été associées à des pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales (Pohl, 1993).

Le rôle du fond génétique dans la pathogénicité des souches d'*E.coli* est attesté par le lien observé entre le type de pathologie et les différents groupes phylogénétiques de l'espèce. En effet, l'analyse phylogénétique a montré qu'*Escherichia coli* est composé de quatre principaux groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) et que les souches extra-intestinales virulentes appartiennent principalement aux groupes B2 et D. alors que la plupart des souches commensales appartiennent au groupe A et B1 (Escobar-Páramo *et al.*, 2004a).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail a été la détermination par PCR des groupes phylogénétiques des souches d'*E.coli* isolées à partir de moules sauvages et de moules d'élevage.

Chapitre I

Généralités

I Généralités

I.1 Généralités sur la conchyliculture et la moule

I.1.1 Généralités sur la conchyliculture

Selon le FAO l'aquaculture est «l'élevage d'organismes aquatiques (poissons, mollusques, crustacés, plantes aquatiques...). L'aquaculture des mollusques concerne principalement l'élevage des coquillages ou conchyliculture. Le terme de conchyliculture est récent et date du milieu du XXème siècle, c'est une aquaculture essentiellement marine. C'est également une activité vivrière principalement développée en Asie: des Ostréidés (huîtres), des Mytilidés (moules), des Pectinidés (pétoncles), des Vénéridés (palourdes) sont élevées (IFREMER, 2006).

Depuis quelques années, une conchyliculture d'eau douce apparaît en Chine avec la culture d'escargo d'eau douce (*Cipangopaludina chinensis*), de cygne (*Anodonta cygnea*) et de clam d'Asie (*Corbicula fluminea*). La production 2008 pour ces espèces est de 220 000 tonnes (IFREMER, 2006).

I.1.2 Définition de la mytiliculture

C'est une activité aquacole qui s'intéresse principalement aux moules de la famille des Mytilidés, l'espèce la plus cultivée en Méditerranée est *Mytilus galloprovincialis*. La mytiliculture est pratiquée en mer, dans des filières mytilicoles, bouchots ou tables mytilicoles.

I.1.3 La production mondiale

Selon le FAO (2010) en 2008, la conchyliculture représente 24,9% de la production aquacole mondiale avec une production de 13 millions de tonnes (en stagnation par rapport à 2007). La conchyliculture est essentiellement asiatique, mais est présente sur les autres continents, à l'exception de l'Afrique (pour des productions significatives) (**Figure1**). Les principales espèces composant la production de mollusques en 2008 étaient les huîtres (31,8 pour cent), les palourdes et les clams (24,6 pour cent), les moules (12,4 pour cent) et les pétoncles (10,7 pour cent). Globalement, la production de mollusques a augmenté à un rythme moyen de 3,7 pour cent par an entre 2000 et 2008, mais sur la même période, la production «de luxe» d'ormeaux est passée de 2 800 tonnes à 40 800 tonnes, soit une croissance annuelle de 39,9 pour cent (FAO, 2010).

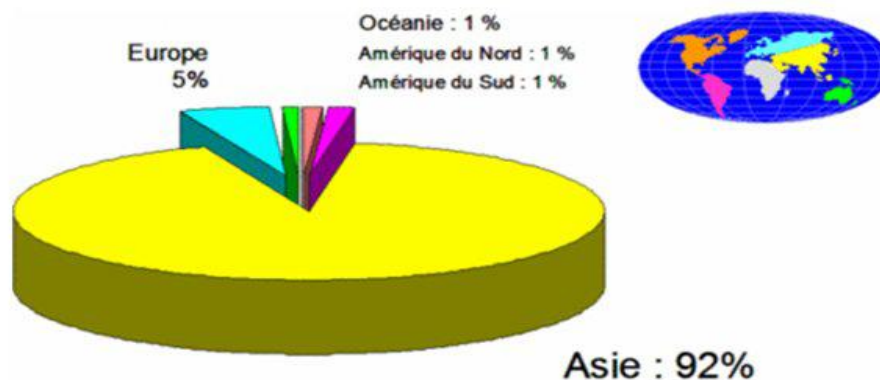


Figure 1 : La conchyliculture mondiale (FAO 2010)

I.1.4 La mytiliculture en Algérie

L'aquaculture algérienne est en phase de démarrage en matière de production, actuellement la conchyliculture pratiquée par un opérateur privé produisant quelques dizaines de tonnes de moules méditerranéennes et d'huîtres creuses du Pacifique (FAO, 2011).

I.2 Présentation de la moule *Mytilus galloprovincialis*

Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) est un mollusque appartenant à la classe des Bivalves. Les moules font partie de la famille des mytilidés caractérisés par des valves égales, un ligament presque toujours externe, une charnière sans dent (ou avec des dents très réduites), des branchies à filaments séparés, deux muscles adducteurs (l'antérieur est rarement absent), un pied allongé et un byssus. Le genre *Mytilus* extrêmement répandu dans le monde renferme plusieurs espèces dont *Mytilus galloprovincialis*.

I.2.1 Systématique de la moule (Source : www.zipcodezoo.com)

Embranchement	Mollusques
Classe	Lamellibranches
Ordre	Fillibranches
Sous Ordre	Anisomyaria
Super famille	Mytiloidea
Famille	Mytilidae
Sous famille	Mytilinae
Genre	<i>Mytilus</i>
Espèce	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819)

I.2.2 Morphologie :

- **Aspect extérieur :**

La coquille plus ou moins renflée, possède une extrémité pointue et l'autre arrondie. Elle comprend deux valves unies par un ligament. La couleur, généralement bleu noir, peut toute fois être brune, voir jaune (**Figure 2**). On peut observer de fines stries concentriques qui sont des stries d'accroissement représentant les étapes de la croissance de l'animal. La taille commune de la moule varie entre 5 et 8 cm ; avec un maximum de 15 cm (Marteil, 1976)



Figure 2 : Aspect extérieur de la moule (Boughachiche et SI Abdallah, 2011)

- **Aspect intérieur :**

La coloration de l'intérieur de la valve est bleu ardoisé très foncé ; presque noir vers les bords postérieurs, et presque blanc sous les crochets (**Figure 3**) (Djediati, 1993).



Figure 3 : Aspect intérieur de la moule (Boughachiche et SI Abdallah, 2011)

I.2.3 Anatomie : (Figure 4)

- **Charnière et ligament :**

La charnière est réduite et l'union des valves est assurée à peu près exclusivement par le ligament. Il est formé de conchyoline (substance apparentée à la chitine) et est constitué d'une partie externe qui est étirée lors de la fermeture des valves et d'une partie interne que cette fermeture comprime. Ces deux couches, par leur élasticité, tendent à provoquer l'ouverture de la coquille (Marteil, 1976).

- **Le manteau :**

Le manteau est une enveloppe pellucide, dans lequel se trouvent les muscles, le système nerveux et les vaisseaux sanguins. Le manteau joue un rôle non négligeable dans la circulation de l'eau au niveau des branchies ; il participe à la respiration grâce à un échange direct de gaz avec l'eau environnante et accumule des réserves. Toutefois, son rôle principal est d'assurer la formation de la coquille (Marteil, 1976).

- **Les muscles adducteurs :**

Deux muscles adducteurs dont un, l'antérieur, est réduit, s'opposent à l'action mécanique du ligament : par leur contraction ils ferment la coquille (Marteil, 1976). Insérés perpendiculairement aux valves, ils marquent sur la face interne des valves leurs insertions d'impressions (Marteil, 1976).

- **Le pied et le byssus:**

Le pied est une saillie musculaire située au-dessous de la masse viscérale. Sa grande mobilité est due à l'existence de deux systèmes de faisceaux musculaires, l'un inséré sur les valves, l'autre sans rapport avec elles. Le byssus, de nature protéinique, est constitué de nombreux filaments terminés par un disque adhésif. Leur résistance est considérable ; toutefois, la moule peut les rompre les uns après les autres, ce qui lui permet de se déplacer sur son support et de se refixer un peu plus loin (Marteil, 1976).

- **Les branchies :**

Les branchies ou cténidies sont une caractéristique majeur des lamellibranches (Helm et al., 2006), elles consistent en deux grands organes en feuilles opérants deux séries de phénomènes, la respiration et la filtration de la nourriture à partir de l'eau. Elles sont au nombre de deux. Reliées à la masse viscérale par l'intermédiaire de l'axe branchial.

Chacune est constituée de deux rangées de filaments aplatis, ces filaments se dirigent vers la face ventrale du mollusque (branche directe ou descendante), se recourbent brusquement, puis remontent vers la face dorsale (branche réfléchie ou ascendante). Les filaments sont tous semblables et disposés en séries uniformes (Marteil, 1976).

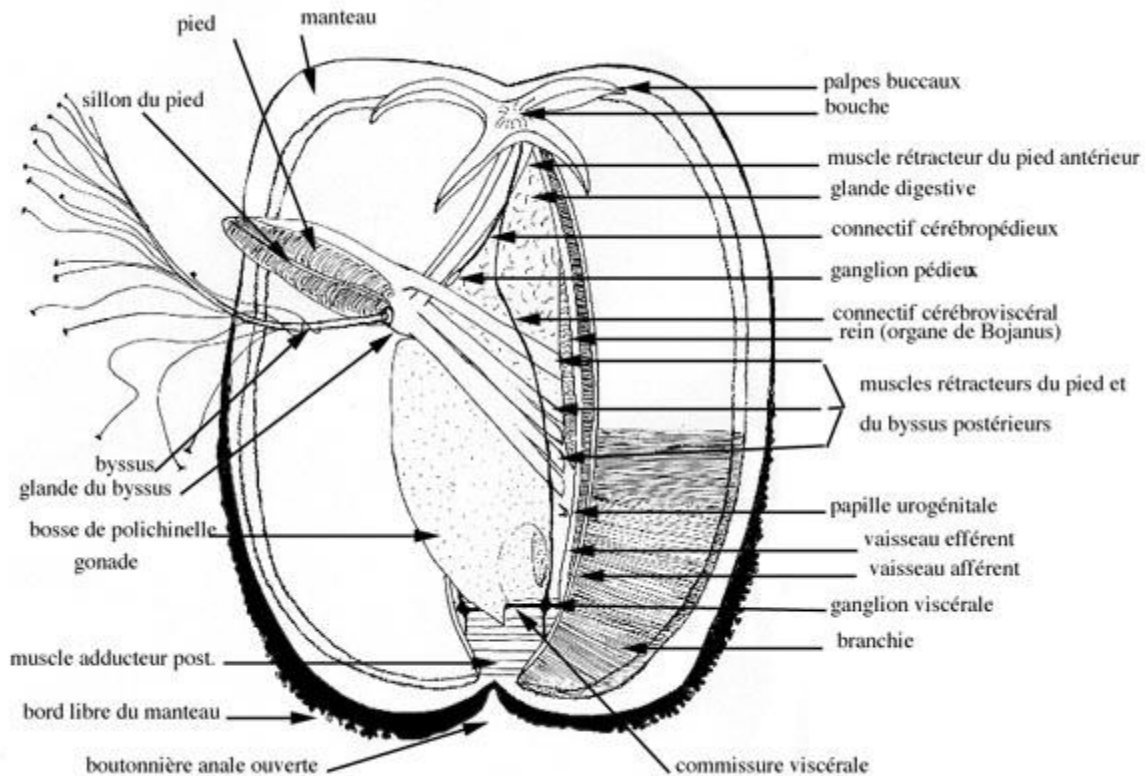


Figure 4 : Anatomie interne de la moule (Ducruet, 2000)

I.2.4 Reproduction

Les moules sont des animaux à sexes séparés et le nombre des mâles est à peu près égal à celui des femelles. Lubet (1959 in marteil 1976) a suivi pendant plusieurs années le cycle de nombreux individus et n'a jamais constaté de changement de sexe. Elles sont dépourvues de caractères sexuels secondaires. Toutefois, en période de maturité, la couleur de la gonade nous permet de déterminer le sexe. Ainsi, la gonade femelle aura des teintes allant du jaune- orangé au rose-saumon, tandis que la gonade male sera blanche-jaunâtre (Haouchine, 1995). Cette coloration n'est pas suffisante pour pouvoir discerner avec certitude le sexe, (Djediat, 1993), l'examen de couleur de la gonade doit être donc suivi d'un examen microscopique. Chez la moule, la glande génitale ou gonade s'étend de façon diffuse dans le manteau.

Elle est constituée d'une multitude de follicules (masses de cellules sécrétrices entourant l'extrémité en cul-de-sac du canal excréteur) où se forment, selon le sexe, les ovules ou les spermatozoïdes. Les canaux excréteurs ou gonoductes se regroupent jusqu'à ne plus former que quelques troncs principaux qui convergent en dessous du péricarde et les gonoductes terminaux, un de chaque côté du corps, aboutissent à deux papilles génitales situées près du muscle adducteur postérieur (Marteil, 1976).

I.2.5 Régime alimentaire

Comme tous les filtreurs, la moule vit, pour l'essentiel, aux dépend des particules en suspension dans l'eau (Dardignac-Corbeil, 1989). Elle se nourrit de petits éléments (phytoplancton, zooplancton, bactérie, fragment d'algues, des détritiques, vase...etc) (MPRH, 2001).

La qualité des aliments en suspension joue un rôle important. Si l'eau contient une grande proportion d'éléments sans valeur nutritive (grain de sable ou des particules de vase), la moule est obligée de filtrer des quantités très importantes pour récupérer les particules nutritives dont elle a besoin ; elle peut avoir bien du mal à assurer sa ration journalière. Sa croissance est alors ralentie, voire stoppée. (MPRH, 2001).

La moule peut filtrer l'eau pendant 18.5 à 24 heures par jour sans interruption avec une vitesse moyenne de 20 l/h. Cependant, la durée et le temps de filtration varient en fonction des différents paramètres de température, de salinité et d'oxygène (Marteil, 1976). Le courant d'eau inhalé passe à travers la branchie (**Figure 5**) qui comporte des sillons garnis de cellules muqueuses qui agglomèrent les particules en suspension, dans l'eau les microparticules consommables sont transportés jusqu'à la bouche, alors que les particules non consommables sont rejetées à l'extérieur (pseudo fèces) (Marteil, 1976).

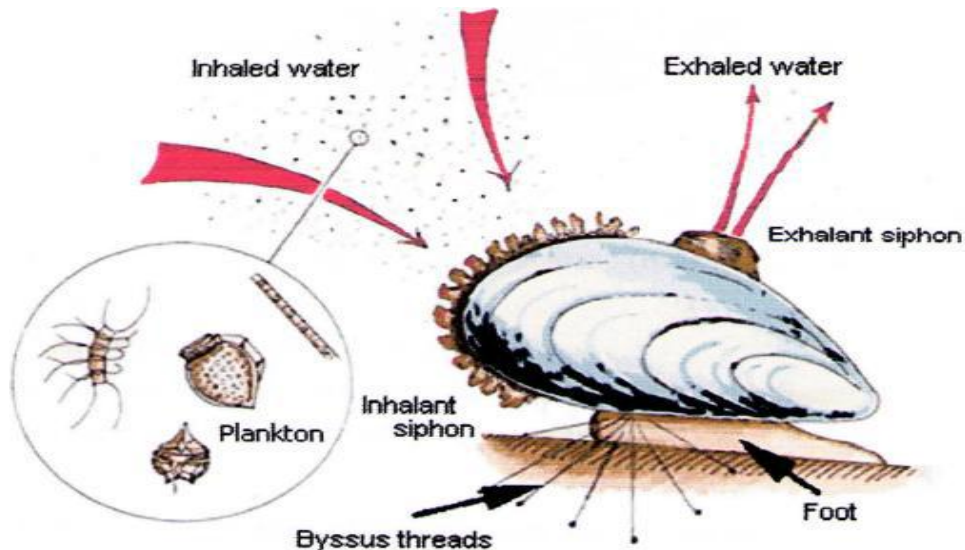


Figure 5 : Nutrition et respiration chez la moule (Lars-Ove Loo, 2000)

I.2.6 Les risques sanitaires liés à la consommation des coquillages

Les bivalves sont de véritables accumulateurs d'impuretés. Les germes de contamination se concentrent non seulement dans le liquide intervalvaire, mais aussi dans les différents segments du corps, à savoir l'hépatopancréas, les branchies, les muscles adducteurs des valves et le manteau (Brisou et col, 1962). Les bivalves donnent la chance de survie aux bactéries qu'elles retiennent, quelque soit leur nature. Cette accumulation de bactéries dépend de la nature des germes et de l'état physiologique des bivalves (Guillaud et Romana, 1996).

L'ingestion des coquillages insalubres peut représenter un danger pour la santé de l'homme. Ces accidents d'origine bactérienne ou virale résultent soit par la contamination directe des coquillages dues aux eaux polluées dans lesquelles ils vivent, soit lors du transport, de la manutention ou de la préparation du fruit de mer en vue de la consommation, ils peuvent provoquer des diarrhées et des hépatites, ce sont d'ailleurs les manifestations les plus fréquentes des toxi-infections alimentaires. Le premier cas d'intoxication a été signalé en 1793 en Colombie anglaise, où plusieurs membres d'un équipage ayant consommés des moules recueillies dans un port, furent pris quelques heures après des troubles, entraînant la mort de certains d'entre eux (Cerbom, 1964).

En 1990, plus de deux cents cas ont été enregistrés en France à la suite de la consommation de moules importées du Danemark (Vivares, 1991).

De plus dans la même année, les produits de la mer ont été incriminés dans 29 des 225 cas de toxi-infections alimentaires collectives pour lesquels l'aliment en cause avait pu être retrouvé (Pignault et *al.*, 1991 in Poggi et Le Gall, 1995).

Les risques liés à la consommation des coquillages sont essentiellement liés à quelques bactéries, virus et toxines.

II Présentation d'*Escherichia coli*

II.1 Coliformes fécaux et *E.coli*

Les coliformes fécaux sont des bâtonnets à Gram négatif de 2 à 3 µm de long et 0,5 µm de large, aérobies et facultativement anaérobies ; non sporulant, capables de fermenter le lactose avec production de l'acide et de gaz à 36 et 44°C en moins de 24 heures.

Ils produisent de l'indole dans l'eau peptonée exempt d'indole contenant du tryptophane à 44°C, on les désigne souvent sous le nom d'*Escherichia*.

L'intérêt de la détection de ces coliformes, à titre d'organismes indicateurs, réside dans le fait que leur survie dans l'environnement est généralement équivalente à celle des bactéries pathogènes et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales (CEAEQ, 2000).

II.2 Taxonomie

Les *Escherichia coli* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Systematiques d'*Escherichia coli* (Castellani et Chalmers, 1919)

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>E. coli</i>

Sept critères définissent classiquement cette bactérie : un Gram négatif, une culture facile, l'absence d'oxydase, la capacité de réduire les nitrates, une aéro-anaérobie facultative, la capacité à fermenter le glucose et leur mobilité grâce à la possession d'une ciliature péritriche.

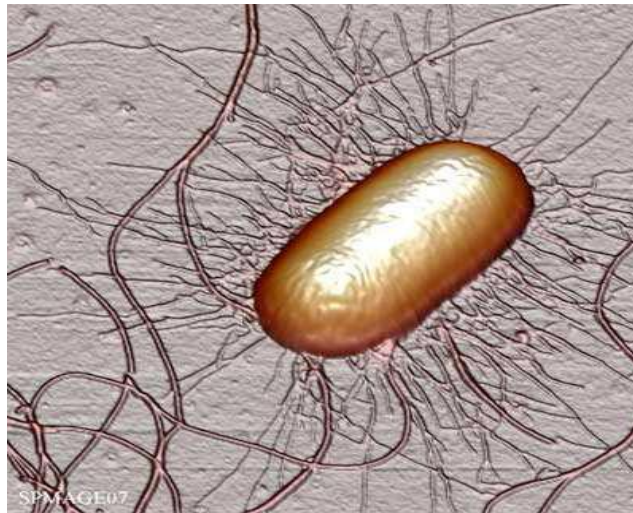


Figure 6 : Observation de la ciliature péritriche d'*E. coli* par microscope électronique
(www.globepharma.org)

II.3 Caractères culturels d'*E. coli*

Les *E. coli* poussent très bien sur des milieux ordinaires à base de viande. Elles sont le plus fréquemment sous forme de colonies rondes, lisses (ou smooth « S »), à bords réguliers, ont un diamètre de 2 à 3 mm, après 18 h d'incubation à 37°C. Il n'est pas exceptionnel d'isoler des souches d'*E. coli* ne présentant pas tous les caractères habituels mentionnés ci-dessus, ce sont des souches atypiques. Par exemple, on peut trouver des *E. coli* formant des colonies naines qui résultent de déficiences métaboliques à cause des mutations (déficiency en thymidine, en thiamine...).

II.4 Caractères biochimiques

Les principaux caractères sont: absence de production d'oxydase, absence d'uréase, fermentation du lactose, production d'indole, absence de croissance sur le citrate et pas de production de H₂S. Le reste des caractères est indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'*E. coli* (Minor et Richard, 1993)

Tests biochimiques	<i>E. coli</i>
Oxydase	-
Lactose	+ ou (+)
Test ONPG	+
H ₂ S	-
LDC	d
ODC	d
ADH	d
Uréase	-
TDA, PDA	-
Indole	+
Citrate de Simmons	-
Malonate	-
VP	-
TTR	-
Gélatinase	-
Gaz-glucose	+
Mannitol	+
Saccharose	d
Inositol	-
Adonitol	-
Galacturonate	+
Mobilité	+

Abréviation. **LDC** : Lysine-décarboxylase, **ODC** : Ornithine-décarboxylase, **ADH** : Arginine-dihydrolase, **TTR**: tétrathionate-réductase, **VP** : Vogues-Proskauer (recherche de l'acétoïne), **TDA, PDA** : désaminases du tryptophane et de la phénylalanine, **ONPG**: orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside, **d**: Différents types biochimiques, + : positif en 1 à 2 jours, (+) : positif de 3 à 7 jours, - : négatif.

Il est important de confronter la classification phylogénique basée sur les ARN16S à la classification basée sur les caractères biochimiques. Des études phylogénétiques basées sur le séquençage des gènes codant l'ARN ribosomal 16S, ont montré que *E. coli* et *Salmonella* auraient divergé à partir d'un ancêtre commun il y a 120 à 160 millions d'années. Les *Shigella* auraient émergé des *E. coli* il y a Environ 80 millions d'années. Par hybridations ADN-ADN, Brenner et *al.* (1972) ont montré que *Shigella* et *E. coli* partageaient plus de 75 % de similarité.

De plus, la position des *Shigella* et des *E. coli* a été clarifiée par analyse en MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) : Pupo et al. (1997) ont montré que les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), entérotoxigènes (EPEC) et entérotoxino-gènes (ETEC) étaient répartis en plusieurs lignées à l'intérieur des groupes phylogénétiques A et B1. Le groupe B2 était relié aux souches responsables d'infections du tractus urinaire, bactériémies et méningites néonatales mais pas aux souches diarrhéiques.

Les EIEC, EPEC, ETEC et les Shigelles ont dû évoluer de façon indépendante en différentes lignées et en plusieurs étapes, probablement avec l'acquisition horizontale de facteurs de virulence (Johnson, 2000). Plus généralement, *E. coli* est considérée comme un hôte normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales à sang chaud.

A ce titre *E. coli*, et plus largement les coliformes thermo-tolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournissant une indication sur l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive, notamment les Salmonelles. Un grand nombre de ces *E. coli* ne sont pas pathogènes. Cependant, certaines souches sont connues des médecins comme des agents pathogènes responsables de gastro-entérites infantiles ou de la fameuse "diarrhée du voyageur", souvent d'origine hydrique.

II.5 Le squelette génomique de l'espèce

L'analyse comparative des différents génomes disponibles à ce jour confirme une variabilité de taille des génomes au sein de l'espèce *E. coli*. La plupart des souches pathogènes possèdent des génomes de plus grande taille par rapport à ceux des souches commensales. Le génome de la souche d'*E. coli* K-12 séquencée en 1997 est constitué de $4,7 \times 10^6$ paires de bases (4 200 protéines codées).

Certains gènes sont communs à toutes les souches d'*E. coli* et définissent le squelette génomique qui théoriquement comprend tous les gènes communs à toutes les souches de cette même espèce et codent des fonctions essentielles à leur physiologie (Welch et al., 2002). L'analyse de ces gènes permet d'étudier les relations génétiques entre espèces. Cependant le nombre de gènes constituant ce squelette dépend principalement du nombre et de la diversité des organismes comparés (Miquel, 2010).

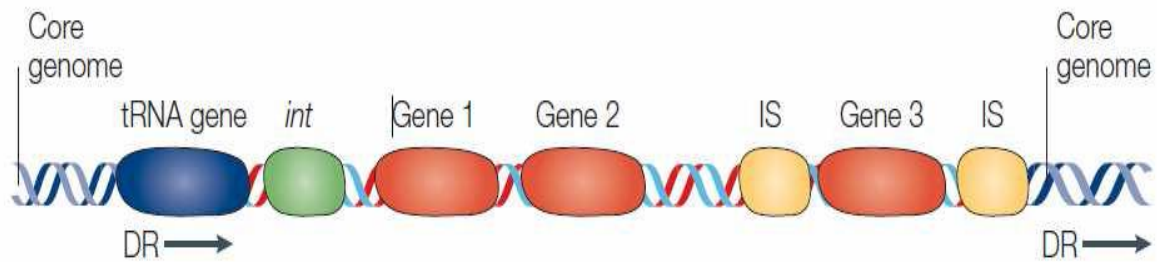


Figure 7 : Caractéristiques générales d'un îlot génomique

Les îlots génomiques sont acquis par transferts horizontaux et généralement intégrés dans le squelette génomique bactérien au niveau des gènes codant les ARN de transfert. Ces îlots sont bordés par des structures en répétition directes (DR) et comprennent différents gènes, notamment des séquences d'insertion (IS) et des gènes codant des intégrases (*int*) impliqués dans leur mobilité (d'après Dobrindt *et al.*, 2004).

II.6 Subdivisions de l'espèce *E. coli*

L'espèce *E. coli* est constituée d'une multitude de souches qui peuvent être différenciées et classées par la détermination de leur BIOTYPES, SEROTYPES et LYSOTYPES (Mainil, 2003).

- **Le BIOTYPE** est le profil biochimique des souches. À côté des caractères d'espèce, les souches d'*E. coli* varient, en effet, par différents autres caractères biochimiques (Bergan, 1984 ; Brenner, 1984 ; Bettelheim, 1994).
- **Le SEROTYPE** est défini par la combinaison de certains antigènes de surface que l'on peut mettre en évidence : les antigènes somatiques O (de l'Allemand "**O**hne **K**apsel ") de nature lipopolysaccharidique (LPS), les antigènes capsulaires K (ou antigènes de **K**auffmann) de nature polysaccharidique et les antigènes ciliaires H (de l'Allemand "**H**auch ") de nature protéique (Sojka, 1965 ; Orskov et Orskov, 1984 ; Lior, 1994). Les bases du schéma d'identification par sérotypie ont été définies par Kauffmann (Kauffmann, 1947 ; Kaackenbeeck, 1993). Actuellement, environ 180 groupes O, 80 groupes K et 70 groupes H ont été reconnus (Orskov et Orskov, 1984 ; 1992) (**Figure 8**).

- Le **LYSOTYPE** est le spectre de sensibilité d'une souche à une collection de bactériophages (Sojka, 1965 ; Lior, 1994). Cependant, contrairement au sérotypage, il n'existe pas de collection internationale de référence de bactériophages à utiliser. Aussi, la lysotypie est-elle relativement peu appliquée, sauf pour certaines souches particulièrement importantes en pathologie (Lior, 1994).

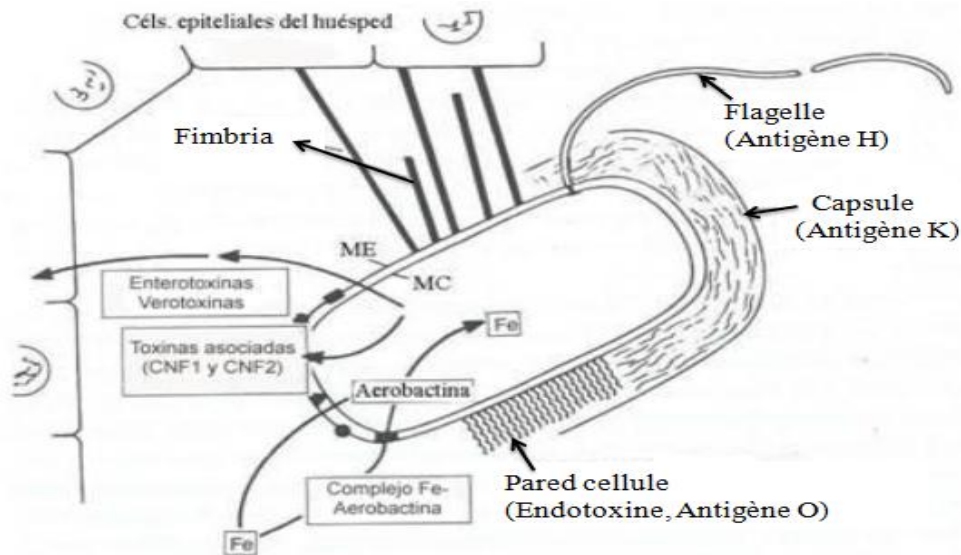


Figure 8 : Structure des antigènes (Hakim et Hammami, 2010)

II.6.1 Classification des *E. coli* responsables des troubles intestinaux

Divers chercheurs ont réussi à mettre en évidence l'existence pour les souches pathogènes de propriétés particulières, dites de virulence, directement ou indirectement reliées à leur pouvoir pathogène.

Ces propriétés permettent aux bactéries de coloniser les surfaces muqueuses de l'hôte, de les franchir, de résister aux défenses internes ou de produire un effet toxique sur cet hôte, avec apparition de lésions et de signes cliniques (Cooke, 1985 ; Pohl, 1993 ; Lior, 1994; Sussman, 1997 ;Wray et Woodward, 1997).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de classification standardisée des souches appartenant à l'espèce *E. coli*. Les médecins utilisent une classification basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques comprenant 6 groupes (**Figure 9**) :

- Les *E. coli* **Entérotoxigènes (ETEC)** majoritairement associés à 2 syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de

développement et la « fameuse » diarrhée du voyageur. Les ETEC sont définis comme des souches possédant au moins une toxine appartenant soit au groupe des entérotoxines thermostables (ST), soit au groupe des entérotoxines thermolabiles (LT). Ils possèdent également d'autres facteurs de virulence leur permettant de coloniser la muqueuse intestinale ;

- **Les *E. coli* Entéropathogènes (EPEC)** sont responsables de diarrhées infantiles. Lors d'infections apparaissent des lésions histopathologiques particulières, appelées lésions d'attachement et effacement (lésions A/E). Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhérence intime entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* sont à l'origine de ces lésions ;
- **Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)** présentent un phénotype d'adhésion aux cellules Hep-2 proche de celui des EPEC mais toutefois différent puisqu'il s'agit d'une adhérence non pas localisée mais diffuse. En revanche, ces souches ne produisent aucune entérotoxine ;
- **Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)** sont biochimiquement et génétiquement assez proches de *Shigella spp*, tout comme leur pathogénie (invasion de l'épithélium intestinal) ;
- **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)** sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. L'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse », sur les lignées cellulaires en culture ;
- **Les *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC)** sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient.

Les EHEC, qui sont des souches isolées chez les malades, possèdent typiquement au moins un gène *stx* (*stx1* codant pour la Shiga-toxine 1 [Stx1] ou *stx2* codant pour la Shiga-toxine 2 [Stx2]) ainsi que d'autres facteurs de virulence comme le gène *eae*. L'ensemble des souches d'*Escherichia coli* possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des STEC [Shiga-toxin-Producing *E. coli*] (ou VTEC selon l'ancienne dénomination internationale [verotoxin-producing *E. coli*]) <http://www.steakexpert.fr/Qu-est-ce-qu-un-STEAC.html>.

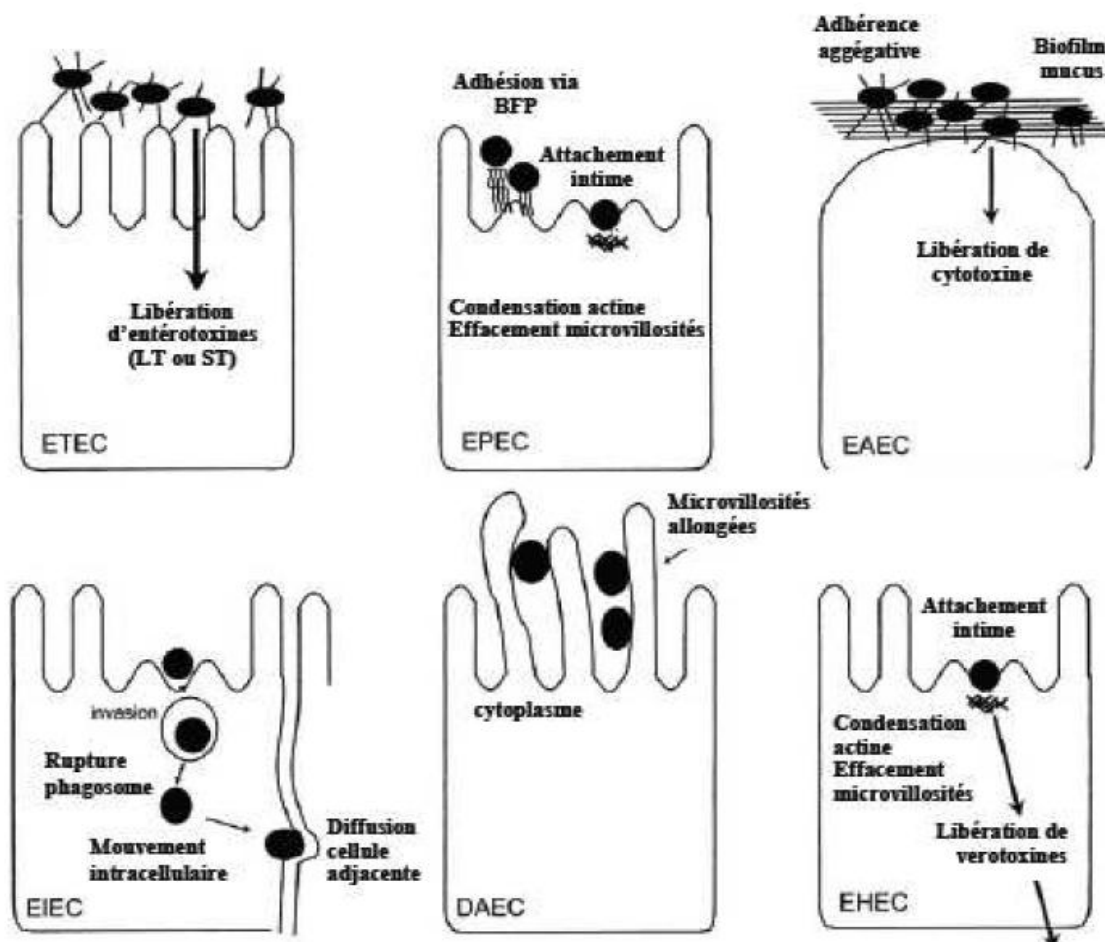


Figure 9 : Pathogénie associée aux six classes d'*E. coli* responsables de diarrhées (d'après Nataro et Kaper, 1998)

II.7 Diversité des souches et pathogénicité

E. coli est une espèce naturellement présente dans le tractus intestinal qui interagit avec son hôte dans une relation mutualiste, on parle alors de souches commensales. Cependant, chez un hôte immunodéprimé, ou lorsque la barrière intestinale est lésée, elles peuvent être à l'origine d'infections. De plus, certaines souches ont la capacité d'induire une large diversité de pathologies chez l'homme ou l'animal du fait de l'expression de facteurs de virulence spécifiques.

Les *E. coli* pathogènes peuvent ainsi être séparés en deux grands groupes en fonction du type d'infection dont ils sont à l'origine (**Figure 10**) (Miquel, 2010).

- Le premier groupe, nommé **ExPEC** pour *E. coli* pathogènes **extra-intestinaux**, comprend les souches à l'origine d'infections du tractus urinaire (Uropathogenic *E. coli* ou UPEC), de méningites et de septicémies (neonatal meningitis *E. coli* ou NMEC) et le pathovar animal aviaire (APEC).
- Le deuxième groupe *E. coli* pathogènes **intestinaux (IntEC)** est à l'origine de syndromes diarrhéiques et comprend six groupes pathogènes ou pathovars. Il s'agit des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), des *E. coli* entéroagréatifs (EAEC), des *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), des *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) et des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) (Pour revues Croxen and Finlay, 2010 ; Guignot and Servin, 2006; Kaper *et al.*, 2004). De nouveaux pathovars sont fréquemment proposés et un des plus étudié est le pathovar AIEC pour adherent-invasive *E. coli* associé à la MC (Miquel 2010).

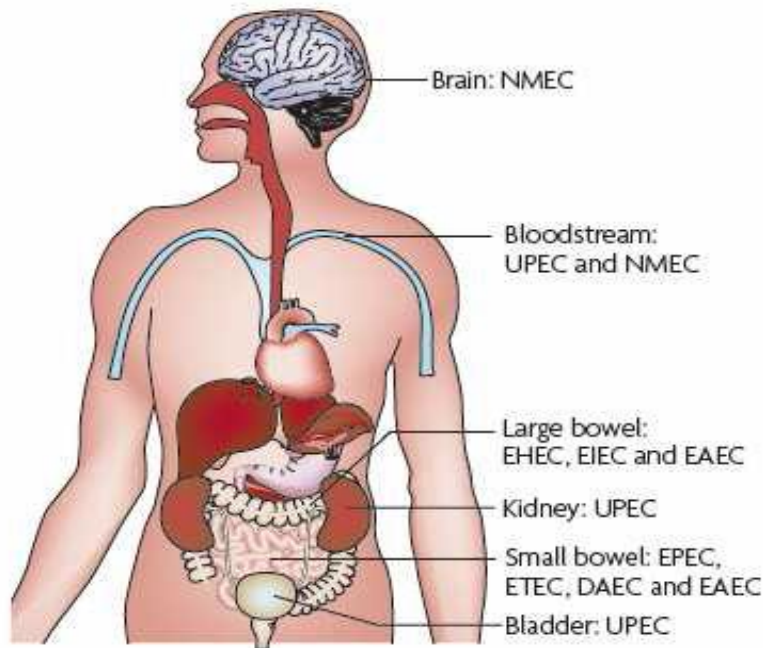


Figure 10 : Différents groupes d'*Escherichia coli* pathogènes

E. coli entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhées, alors que *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* entéroinvasif (EIEC) colonisent plutôt le colon; *E. coli* entéroaggrégatif (EAEC) peut coloniser les deux. *E. coli* uropathogène (UPEC) colonise le tractus urinaire jusqu'à la vessie et est à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie (d'après Croxen et Finlay, 2010).

II.8 Phylogénie de l'espèce *Escherichia coli*

Depuis la fin des années 90 et l'utilisation des automates permettant le développement du séquençage des gènes, plusieurs techniques ont été utilisées pour l'étude génétique des populations :

- **La technique MLST** (Multilocus sequence typing) est reconnue comme la plus puissante pour l'étude génétique des populations (Enright and Spratt, 1999). Elle mesure directement la variation de la séquence ADN dans un groupe de gènes dits « gènes de ménage », connus pour avoir subi peu de recombinaison, caractérisant ainsi les souches par un profil allélique unique.

- Une **technique d'amplification par PCR** de trois fragments d'ADN (*chuA*, *yjaA* et *TSP E4.C2*), PCR triplex, a été mise au point afin de déterminer plus simplement l'appartenance de certains isolats aux quatre groupes phylogénétiques majeurs (B2, D, B1 et A) (**Figure 12**) (Clermont et al., 2000). Cette méthode simple a montré une bonne corrélation avec la technique MLST même si elle est moins précise (Gordon et al., 2008).

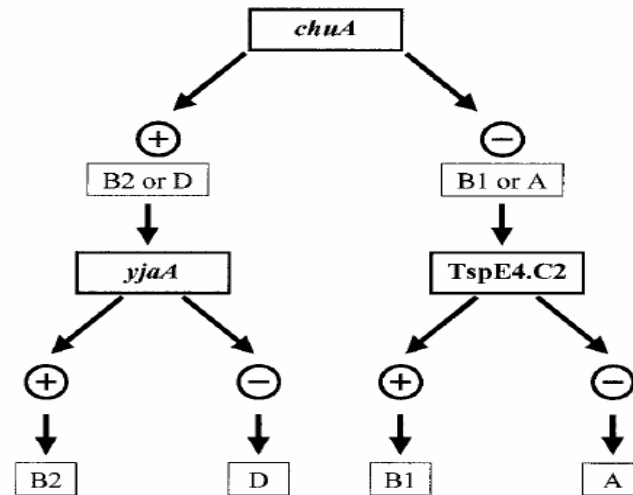


Figure 12 : Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches de *E.coli* par amplification génique (PCR) (Clermont et al., 2000)

Ces études ont permis une description phylogénétique de haute qualité. Les premières branches (Les plus anciennes) sont donc les groupes B2 et deux sous-groupes du groupe actuel D, appelé groupes F et E. Le groupe D proviendrait des branches F et E, les groupes A et B1 seraient apparus plus tard comme des branches soeurs. Comme le groupe B2 est le plus ancien, il contient la plus haute diversité génétique. Le groupe phylogénétique B2 pourrait être considéré du fait de son ancienneté, comme une sous-espèce. Il possède une structure clonale et neuf sous-groupes phylogénétiques.

La diversité phylogénétique dépend donc des facteurs environnementaux; on peut ainsi expliquer la prévalence des quatre groupes phylogénétiques principaux (A, B1, D, et B2). Chez les humains, le groupe A est dominant (40.5%), suivi du groupe B2 (25.5%), puis des groupes B1 et D (17% chacun). Chez les animaux, le groupe dominant est le B1 (41%), suivi du groupe A (22%) et B2 (21%), puis D (16%). Cette variabilité ne peut toutefois pas être attribuée à une affinité pour un hôte spécifique.

A ce jour, seulement quelques souches du groupe B1 ont été isolées chez des animaux exclusivement, et un seul clone non-pathogène du groupe B2 a été isolé, uniquement chez l'homme (Ramos, 2010).

Les souches de méningites néonatales et les souches des autres infections extraintestinales appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique B2. Les facteurs de virulence type adhésine, toxine, système de captation du fer, capsule sont retrouvés essentiellement chez les souches du groupe phylogénétique B2.

Les souches commensales appartiennent majoritairement aux groupes phylogénétiques A et B1 et sont dépourvues de facteurs de virulence.

La structure génétique des populations d'*E. coli* est globalement clonale. Les souches pathogènes dérivent des souches commensales par différents mécanismes dont l'acquisition d'opérons de « virulence », l'inactivation de gènes et des variations alléliques. Toutefois, le rôle du fond génétique dans la pathogénicité est attesté par le lien observé entre le type de pathologie et les différents groupes phylogénétiques de l'espèce (Escobar-Páramo et al., 2004a).

Ainsi, il est impératif de connaître la diversité génomique des souches commensales afin de comprendre l'émergence de la virulence. Jusqu'à maintenant, les projets de séquençage de génomes complets se sont concentrés sur quelques souches pathogènes, à l'exception de la souche de laboratoire *E. coli* K12, qui ne sont pas représentatives de la diversité de l'espèce. De plus, le génome complet disponible le plus proche de *E. coli* pour des comparaisons génomiques est celui de l'espèce *Salmonella enterica* qui a divergé il y a 120-160 millions d'années (Ochman et Wilson, 1987). Ce long temps de divergence rend les analyses comparatives difficiles à interpréter.

Le Genoscope va séquencer les génomes de deux souches commensales et quatre souches pathogènes humaines d'*E. coli* représentant un temps évolutif d'environ 40 millions d'années, ainsi que celui de la souche type de l'espèce *E. fergusonii*, le plus proche parent d'*E. coli*. La liste des souches séquencées avec leurs caractéristiques principales est donnée ci-dessous.

Deux souches du groupe phylogénétique B1 :

- La souche IAI 1, de séro groupe O8, a été isolée des selles d'un homme sain dans les années 1980 en France, ne présente aucun des facteurs de « virulence » extraintestinaux connus et est avirulente dans un modèle d'infection extraintestinale chez la souris (Picard et *al.*, 1999).
- La souche 55989 est un isolat associé à une diarrhée et appartenant au pathotype entéroaggrégatif d'*E. coli*. Ce pathotype est reconnu comme une cause émergente de diarrhée chez les enfants et adultes de par le monde (Bernier et *al.*, 2002).

Deux souches du groupe phylogénétique D représentant les deux sous groupes majeurs de D :

- La souche IAI 39, de sérotype O7 :K1, a été isolée de l'urine d'un patient présentant une infection urinaire dans les années 1980 en France et est virulente dans un modèle d'infection extraintestinale chez la souris (Picard et *al.*, 1999).
- La souche UMN026, de sérotype O17 :K52 :H18, est un représentant d'un groupe clonal d'émergence récente (« le groupe clonal A ») qui a maintenant disséminé à travers le monde et qui est responsable d'infections urinaires et autres infections extraintestinales résistantes au traitement antibiotique. Cette souche a été isolée à partir d'une femme présentant une cystite aigue non compliquée en 1999 dans l'état du Minnesota aux Etats-Unis (Manges et *al.*, 2001) et est hautement virulente dans le modèle murin d'infection extraintestinal.

Deux souches du groupe phylogénétique B2 :

- La souche ED1a, de séro groupe O81, a été isolée des selles d'un homme sain, n'ayant pas pris d'antibiotique depuis au moins six mois avant le prélèvement, dans les années 2000 en France. Cette souche représente la souche dominante et persistante (sur une période de six mois) dans les selles, ne possède aucun des facteurs de « virulence » extraintestinaux connus et est virulente dans un modèle d'infection extraintestinale chez la souris (Escobar-Páramo et *al.*, 2004b).

- La souche S88, de sérotype O45 :K1, a été isolée en 1999 du liquide céphalorachidien d'un patient atteint de méningite néo natale tardive en France (Bonacorsi et *al.*, 2003). Cette souche est hautement virulente dans le modèle murin d'infection extraintestinal.

II.9 La répartition d'*Escherichia coli* dans l'environnement

E. coli dans l'eau de ruissellement se trouve principalement dans trois compartiments de l'environnement aquatique : (a) dans la colonne d'eau comme des bactéries en suspension ou en agrégats, (b) associé à la matière en suspension ou (c) dans les sédiments. La concentration nominale d'*E. coli* dans l'eau de ruissellement est de 10² à 10⁴ UFC (Unités Formant des Colonies)/ml dont 20 à 50% se trouve attaché à la matière en suspension. La réduction d'*E. coli* dans des bassins d'orage est entraînée par la décantation de la matière en suspension, par la désinfection, par la lumière solaire et par la mortalité de base. De plus, les pathogènes attachés aux particules sont plus protégés contre la lumière solaire et contre la prédation.

Plusieurs sources potentielles de rejet d'*E. coli* sont trouvés dans l'environnement. Les égouts municipaux, les boues d'épuration municipales, certains égouts industriels et les installations septiques défectueuses en sont des exemples. Certaines pratiques agricoles comme l'entreposage et l'épandage de lisiers et de fumiers peuvent aussi contribuer à la présence d'*E. coli* dans l'environnement. Cette bactérie a aussi été trouvée dans des composts domestiques et des biosolides provenant d'usines de pâtes et papiers. Les animaux sauvages constituent également une source d'*E. coli* en milieu naturel (Vergeynst, 2010)

Les standards actuels quant à la qualité de l'eau sont basés sur la concentration des organismes indicateurs et varient en fonction de l'utilisation qui en sera faite (eau potable, irrigation, eau pour le bétail, usage récréatif) (Jamieson et *al.*, 2004). La présence d'organismes indicateurs dans l'eau est utilisée pour exprimer le risque d'infections chez les humains par des pathogènes. La concentration des coliformes fécaux est l'indicateur le plus commun. Cependant, la gastroentérite associée à la baignade est davantage corrélée avec la concentration d'*E. coli* (USEPA, 2001). Le standard de qualité pour la concentration des coliformes fécaux du Conseil Canadien des Ministres d'Environnement (CCME) est de 100 UFC/ ml pour l'irrigation et de 200 UFC/ ml pour l'usage récréatif. Les coliformes fécaux ne peuvent pas être présents dans l'eau potable (CCME, 1999).

Cependant, le CCME ne fournit pas de standard de qualité basé sur la présence d'*E. coli*. Plusieurs auteurs ont étudié les pathogènes dans l'eau de ruissellement et ont rapporté des concentrations d'*E. coli* entre 10² et 10⁴ UFC=100ml (Jeng et al., 2005; Krometis et al., 2007; Characklis et al., 2005; Garcia-Armisen et Servais, 2009).

Chapitre II

Matériel et méthodes

II Matériel et Méthodes

II.1 Présentation du site

- **Bordj EL Kiffan « Bateau cassé »**

Le site de prélèvement des moules sauvage : « Bateau cassé » situé à Ford de l'eau, Bordj El Kiffan, à l'Est de la wilaya d'Alger. C'est une zone d'agglomération qui contient une plage de baignade, située pas loin de l'embouchure d'oued-el Hamiz (Bouich et Radja, 2012).

- **La ferme conchylicole « SARL ORCA marine »**

Les moules d'élevages ont été procurées à partir de la ferme conchylicole « ORCA marine » située à Ain Chrob « ex Sercouf », à l'est de la wilaya d'Alger. Le site se trouve à 800m au large dans la plage de la commune d'Ain Taya Wilaya d'Alger située en dehors de la baie d'Alger (Bouich et Radja, 2012).

II.2 Présentation des souches

Notre travail a concerné 30 coliformes isolés en 2012 à partir de la moule « *Mytilus galloprovincialis* » dont 15 ont été isolées à partir de moules sauvages récoltées au niveau de bateau cassé et 15 souches ont été isolées à partir de moules d'élevages collectées de la ferme « ORCA marine » (Bouich et Radja, 2012). Ces souches ont été évaluées pour leur résistance aux antibiotiques et leurs profils de résistance sont présentés dans le tableau2 (Alioui et Zebila, 2013).

Tableau 2 : Profils d’antibio-résistance des 30 coliformes isolés à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Alioui et Zebila, 2013)

Souche	Antibiotype	Nombre de résistances
(E12), (S1), (S3),(S4),(E2), (E7), (E18)	-	0
(S2), (E5), (S15)	AX	1
(E1), (E13), (E6)	TE	1
(E16)	AX	1
(E9)	AX-FOX	2
(S6)	AX-TE	2
(S22)	NA-TE	2
(E17)	ATM-CAZ-SSS	3
(S20)	AX-FOX-C	3
(S13)	AX-TE-C	3
(S12)	TMP-SXT-TE-K	4
(E14)	SSS-CIP-PEF-NA-K	5
(S9)	AX-SSS-TMP-SXT-TE	5
(E8)	AX-ATM-CAZ-FOX-NA	5
(S11)	AX-SSS-TMP-SXT-TE	5
(S16)	AX-ATM-CAZ-SSS-TMP-SXT-K	7
(E11)	AX-SSS-TMP-SXT-NA-TE-K	7
(E3), (S7)	AX-SSS-TMP-SXT-CIP-NA-TE-K	8
(S21)	AX-SSS-TMP-SXT-CIP-PEF-NA-TE-K	9

E : Souches isolées à partir de moules d’élevage / **S :** Souches isolées de moules sauvages

II.3 Méthodes

II.3.1 Identification biochimique par galerie API 20 E

Principe

Le système API 20 E est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l’identification des bactéries. Elle comprend 20 tests biochimiques. Lorsqu’une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d’incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs. Elle permet l’identification d’une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries (Biomérieux).

Technique

✓ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation

✓ Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de Suspension Medium (ou un tube d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile)
- Prélever une à trois colonies bien isolées sur milieu gélosé

✓ Inoculation de la galerie

- Inoculer la galerie comme suit :
 - Remplir à l'aide d'une micropipette les tubes et cupules des tests (CIT, VIP et GEL).
 - Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
 - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LCD, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37°C pendant 18-24h
- Le test d'oxydase est réalisé par le dépôt d'un inoculum bactérien sur le disque d'oxydase. La présence du cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette

Lecture de la galerie

Après codification des réactions en un profil numérique, l'identification est obtenue en se référant à un catalogue analytique fourni par Biomérieux où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation (Biomérieux).

II.3.2 Extraction de l'ADN

Principes

C'est une technique de séparation biochimique par précipitations différentielles et séparation des 2 phases obtenues liquide / solide par centrifugation.

Technique

- Préparer l'inoculum bactérien : 3 à 4 colonies dans 50µl d'eau distillée stérile
- Mettre l'inoculum à 100°C pendant 10min pour la lyse
- Centrifuger à 12000trs/min pendant 3min
- Récupérer le surnageant

II.3.3 Détermination des groupes phylogénétiques par PCR

II.3.3.1. Principe de la PCR

La « Polymérase Chain Reaction » est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments.

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température, caractérisé chacun par une réaction chimique distincte (Hoorfar et *al.*, 2004).

Il s'agit de réaliser dans un thermocycler, une succession de réactions de réplication d'une matrice double brins d'ADN. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

Chaque cycle comporte les étapes suivantes :

✓ La phase de dénaturation

Lors de cette étape très courte (environ une minute), une déshybridation d'une séquence cible d'ADN double brin est réalisée entraînant la formation de deux ADN simple brin.

✓ La phase d'hybridation des amorces

Cette étape permet aux amorces de se fixer des deux côtés du fragment d'ADN simple brin spécifique à amplifier. La température de cette étape est fixée en fonction de la température de fusion (T_m) des amorces.

✓ La phase d'élongation

Lors de cette étape, la synthèse de la séquence d'ADN cible a lieu grâce à une enzyme, la Taq-polymérase. A la fin de ce premier cycle de l'ADN double brin est obtenu et un nouveau cycle peut alors recommencer.

II.3.3.2 Recherche des groupes phylogénétiques

Les groupes phylogénétique d' *E. coli* ont été déterminés sur la base de l'amplification de trois marqueurs génétiques selon Clermont et al., (2000): *chuA* : gène nécessaire pour le transport de l'hème chez *E.coli* entérohémorragique O157:H7, *yjaA* : gène de fonction inconnue identifié chez *E.coli* K12 et TspE4.C2 : fragment d'ADN anonyme (Tableau 2) Les groupes phylogénétiques sont comme suit: B2 (*chua+*, *yjaA+*), D (*chua+*, *yjaA-*), B1 (*chua-*, TspE4.C2+) ou A (*chua-*, TspE4.C2-) (Clermont et al., 2000).

II.3.3.3 Mélange réactionnel

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 12.5 µl contenant les concentrations finales suivantes :

- PCR Master mix 1X (Proméga).....6.25µl
- Amorces sens.....0.25 µM
- Amorces antisens.....0.25 µM
- ADN.....2.5 µl
- Eau.....3.25µl

II.3.3.4 Conditions de PCR

Les réactions de PCR de chaque gène se sont déroulées selon le programme suivant :

Une étape de dénaturation de 94°C pendant 5min puis 30 cycles de PCR constitué chacun d'une étape de dénaturation à 94°C/ 30sec, d'hybridation à 55°C / 30 sec et d'élongation à 72°C / 30sec. Enfin, une étape d'élongation finale à 72°C / 7min.

Tableau 3: liste des amorces utilisées pour la détermination de la phylogénie d'*E.coli*

Gène	Séquence d'amorces 5'-3'	Taille de l'amplifiat (pb)	Référence
<i>chuA</i>	chuA-F : GACGAACCAACGGTCAGGAT chuA-R : TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Clermont et al, 2000
<i>yjaA</i>	yjaA-1 : TGAAGTGTCAGGAGACGCTG yjaA-2 : ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	
<i>TSPE4.C2</i>	TspE4.C2-1 : GAGTAATGTCTGGGGCATTCA TspE4.C2-2 : CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	

II.3.4. Electrophorèse

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques (Westermeier, 1997).

Le principe de cette technique est basé sur la migration des amplifiats dans un gel d'agarose (1,2%) de 20cm x 25cm soumis à un courant électrique de 90 volts. Les amplifiats chargés négativement vont migrer vers le pôle positif. La taille des produits d'amplification a été déterminée en utilisant un marqueur de taille de 100pb DNA ladder (proméga). Après migration, une lecture du gel sous ultraviolet est effectuée grâce au bromure d'Ethidium introduit préalablement dans le gel d'agarose. Ce produit possède la propriété d'être fluorescent sous UV.

Solutions

TBE : Tris Borate EDTA

- Tris 45mM,
- Borate 45mM,
- EDTA 1mM.

Bleu de dépôts

- Glycérol 50%
- EDTA-NA₂ 100mM pH : 8,
- Bleu de bromophénol 0,2%,
- Sodium dodécyl sulfate (SDS) 3%.

Chapitre III

Résultats et discussion

III Résultats et discussion

Escherichia coli est une bactérie commensale qui réside dans le tractus gastro-intestinal des mammifères, principalement au niveau du côlon. Certaines souches d'*E. coli* sont aussi des pathogènes intestinaux ou extra-intestinales (système urinaire voire systémique) (Ramos, 2010). Le rôle du fond génétique dans la pathogénicité des souches d'*E.coli* est attesté par le lien observé entre le type de pathologie et les différents groupes phylogénétiques de l'espèce (Escobar-Páramo *et al.*, 2004a). Dans ce contexte, l'objectif de notre travail a été la détermination des groupes phylogénétiques des souches d'*E.coli* isolées à partir de moules sauvages et de moules d'élevage.

III.1. Identification des souches *Escherichia coli*

Parmi les 30 souches de coliformes isolées de la moule *Mytilus galloprovincialis*, 24 souches appartenaient à l'espèce *Escherichia coli*, 4 à *Enterobacter cloacae* et 2 à *Klebsiella pneumoniae*. Notre étude de phylogénie a concerné les 24 *E.coli* dont 11 ont été isolés à partir de moules d'élevage et 13 à partir de moules sauvages (**Tableau 4**).

Tableau 4 : identification des 24 souches d'*Escherichia coli* isolés à partir de moules d'élevages et de moules sauvages

Souche	Numéro de code	Identification
<i>Escherichia coli</i> (E1)	5044552	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (E2)	5044552	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (E3)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (E6)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (E7)	5144572	Bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (E11)	5144152	Bonne (97.7%)
<i>Escherichia coli</i> (E12)	5044552	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (E13)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (E14)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (E17)	5144572	Bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (E18)	5044552	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (S1)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (S2)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (S3)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (S4)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (S6)	7144572	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (S7)	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (S9)	5144552	Excellente (99.9%)
<i>Escherichia coli</i> (S11)	5044572	Excellente (99.9%)
<i>Escherichia coli</i> (S12)	5144552	Excellente (99.9%)
<i>Escherichia coli</i> (S13)	5044542	Bonne (98.1%)
<i>Escherichia coli</i> (S16)	5144562	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (S21)	5144552	Excellente (99.9%)
<i>Escherichia coli</i> (S22)	5144500	Très bonne (79.9%)

E : souches isolées à partir de moules d'élevages / **S :** souches isolées à partir de moules sauvages.

III.2. Recherche des groupes phylogénétiques d'*E.coli*

Les souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis* peuvent être attribuées à quatre principaux groupes phylogénétiques: A, B1, B2 et D. Pour déterminer ces quatre groupes phylogénétiques, une méthode basée sur la détection par PCR de la présence ou l'absence de deux gènes (*chuA* et *yjaA*) et un fragment d'ADN anonyme (*TSPE4.C2*), utilisés comme des marqueurs génétiques (Clermont et al., 2000).

III.2.1. Recherche du gène *chuA*

Les résultats ont montré la présence du gène *chuA* chez deux souches isolées à partir de moules sauvages (S11 et S9) (**Figure 13**). La présence de ce gène implique que ces deux souches appartiennent soit au groupe D ou B2. Alors que toutes les autres feront partie soit du groupe A ou B1.

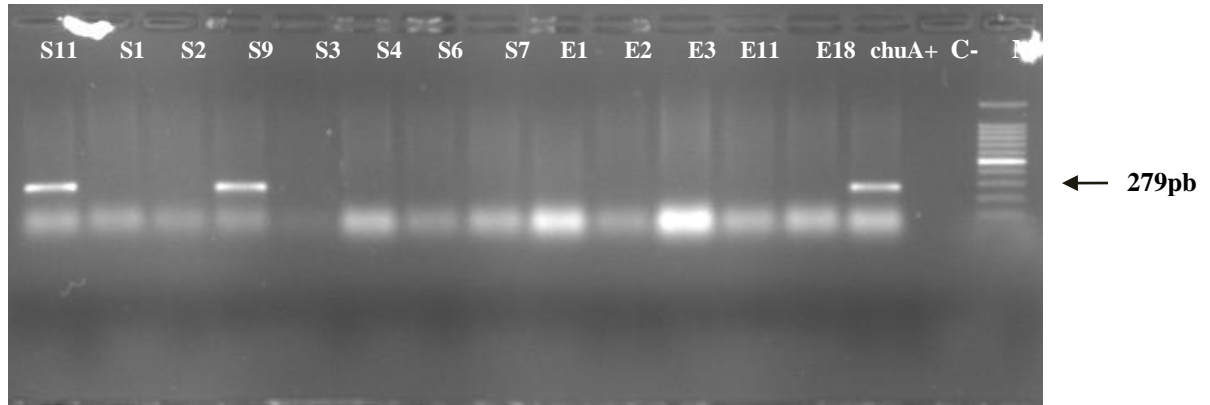


Figure 13 : illustration de la présence du gène *chuA* chez les souches d’*E.coli*. S : souches isolées à partir de moules sauvages, E : souches isolées à partir de moules d’élevages, M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, ChuA+ : contrôle positif. Taille de l’amplifiat : 279pb

III.2.2. Recherche du gène *yjaA*

Le gène *yjaA* a été retrouvé chez cinq souches dont quatre isolées à partir de moules d’élevages (E12, E11, E18, E1) et une isolée à partir de moule sauvage (S9) (**Figure 14**). Ce gène permet la différenciation complète entre le groupe B2 et D. En effet, la souche S9 est positive pour les deux gènes *chuA* et *yjaA* caractéristiques du groupe B2 alors que la souche S11 est positive seulement pour le gène *chuA*, ce qui est caractéristique du groupe D. la présence du gène *yjaA* chez les souches *chuA*- n’est pas prise en considération dans l’interprétation de Clermont et al. (2000).

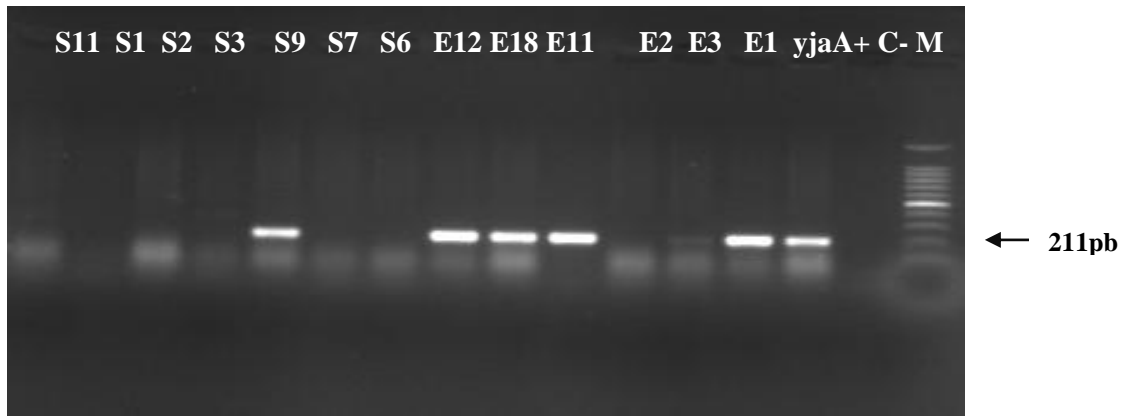


Figure 14: illustration de la présence du gène *yjaA* chez les souches d'*E.coli*. S : souches isolées à partir de moules sauvages, E : souches isolées à partir de moules d'élevages, M : marqueur 100pb DNA ladder, C-: contrôle négatif, yjaA+: contrôle positif. Taille de l'amplifiat : 211pb

III.2.3. Recherche du fragment *TSPE4.C2*

Le fragment d'ADN *TSPE4.C2* a été trouvé chez 13 souches dont 8 isolées à partir de moules sauvages (S1, S4, S6, S7, S9, S11, S16, S22) et cinq isolées à partir de moules d'élevages (E3, E7, E13, E14, E17,) (**Figure 15**). Ce gène est recherché afin de départager entre le groupe A et le groupe B1. La présence de ce fragment d'ADN chez les souches *chuA*- nous permet de classer ces souches dans le groupe B1. Alors que les autres souches négatives pour le *TSPE4C* seront classées dans le groupe A.

Il est à noter que les deux souches *chuA*+ (S9 et S11) possèdent également le fragment *TSPE4C.2*. Cependant, ce critère n'est pas pris en considération dans la classification de Clermont et *al.* (2000).

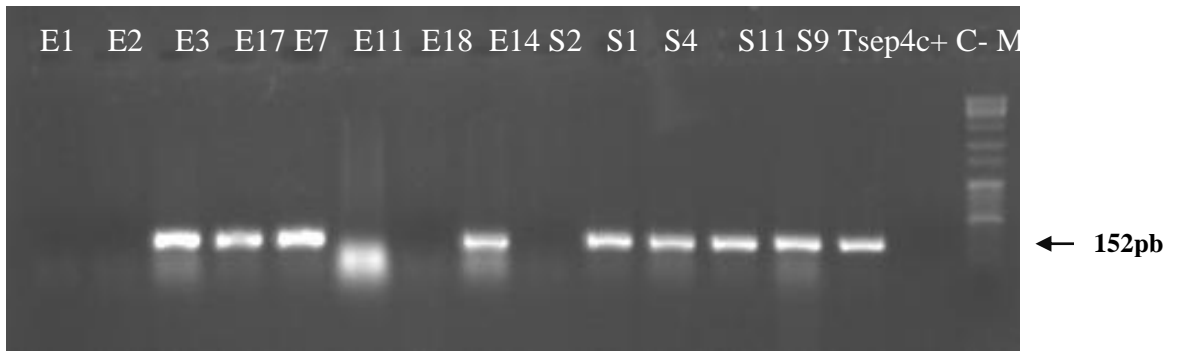


Figure 15 : illustration de la présence du gène *TspE4.C2* chez les souches d'*E.coli*. S : souches isolées à partir de moules sauvages, E : souches isolées à partir de moules d'élevages, M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, TsepE4C+ : contrôle positif. Taille de l'amplifiat : 152pb

III.2.4. Détermination des groupes phylogénétique

Chaque combinaison d'amplification des gènes *chuA* et *yjaA* et le fragment d'ADN *TSPE4.C2* permet une détermination du groupe phylogénétique d'une souche (**Figure 16**). Les groupes phylogénétiques sont comme suit: B2 (*chuA+*, *yjaA+*), D (*chuA+*, *yjaA-*), B1 (*chuA-*, *TspE4.C2+*) ou A (*chuA-*, *TspE4.C2-*) (Clermont *et al.*, 2000).

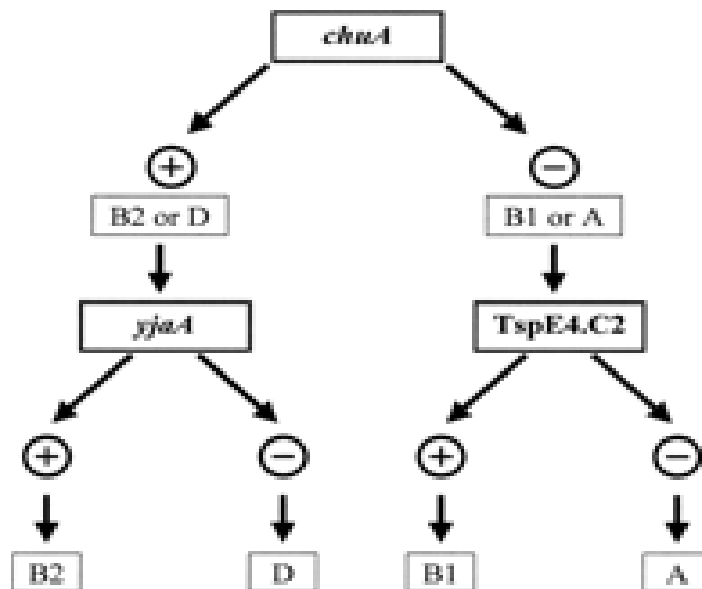


Figure 16 : Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches d'*E.coli* par amplification génique (PCR) (Clermont *et al.*, 2000).

L'interprétation des résultats obtenus dans notre étude a montré que la majorité des souches appartenait au groupe phylogénétique A (45.8%, n= 11) ou B1 (45.8%, n= 11), une seule souche appartenait au groupe D (4.2%, n=1) et une seule souche appartenait au groupe B2 (4.2%, n=1) (**Tableau5, Figure 17**). La majorité des souches (91.6%, n= 22) appartenait aux groupes des souches commensales (A et B1), alors que le groupe (D et B2) n'a représenté que 8.33% (n=2). Chez les animaux, le groupe dominant est le groupe B1, suivi du groupe A et B2, puis D (Ramos, 2010). Cette variabilité ne peut toutefois pas être attribuée à une affinité pour un hôte spécifique. (n= nombre de souches).

Tableau 5 : Résultat de la phylogénie des *E.coli* isolés à partir des moules d'élevages et sauvages

Souche	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TSEP4C</i>	Groupe phylogénétique
E1	-	+	-	A
E2	-	-	-	A
E3	-	-	+	B1
E6	-	-	-	A
E7	-	-	+	B1
E11	-	+	-	A
E12	-	+	-	A
E13	-	-	+	B1
E14	-	-	+	B1
E17	-	-	+	B1
E18	-	+	-	A
S1	-	-	+	B1
S2	-	-	-	A
S3	-	-	-	A
S4	-	-	+	B1
S6	-	-	+	B1
S7	-	-	+	B1
S9	+	+	+	B2
S11	+	-	+	D
S12	-	-	-	A
S13	-	-	-	A
S16	-	-	+	B1
S21	-	-	-	A
S22	-	-	+	B1

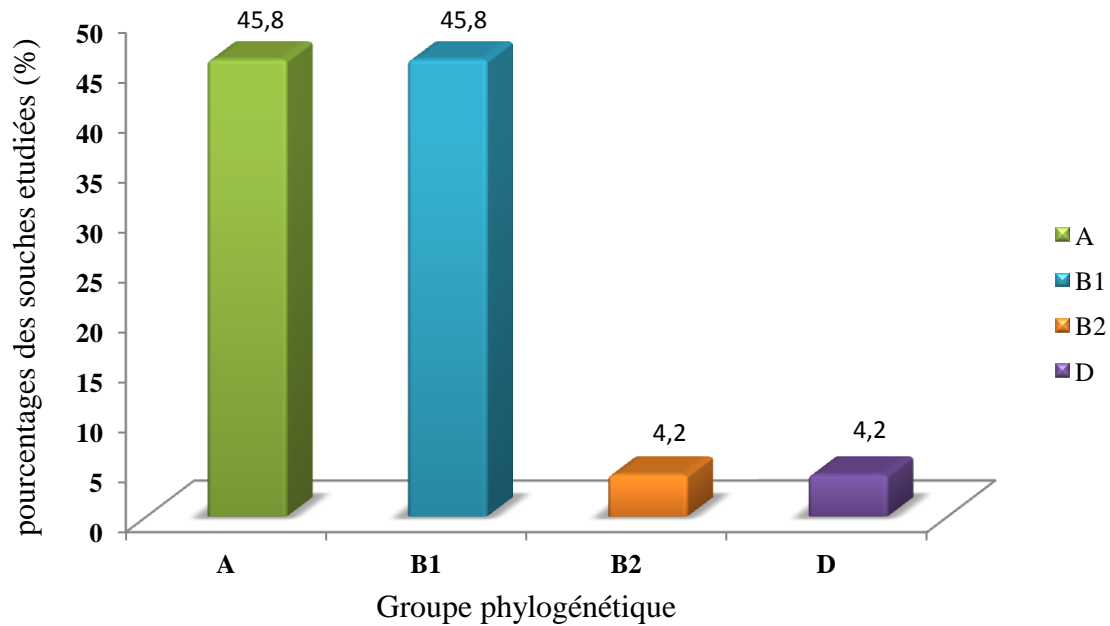


Figure 17 : La répartition des 24 souches d’*E.coli* selon leurs groupes phylogénétiques

La répartition des groupes phylogénétiques selon l’origine des souches est comme suit :

En ce qui concerne les souches isolées à partir des moules d’élevages, elles appartenait toutes au groupe commensale A+B1 avec six souches (54.5%) qui appartenait au groupe A et cinq souches (45.4%) au groupe B1 (**Tableau 5, Figure 18**).

En ce qui concerne les souches isolées à partir des moules sauvages, nous avons pu détecter les groupes phylogénétiques suivants : groupe A (38.4%, n=5), groupe B1 (46.1%, n=6), groupe D (7.6%, n=1), groupe B2 (7.6%, n=1). Donc 84.6% (n=11) des souches appartenait aux souches commensales (**tableau 5, Figure 18**).

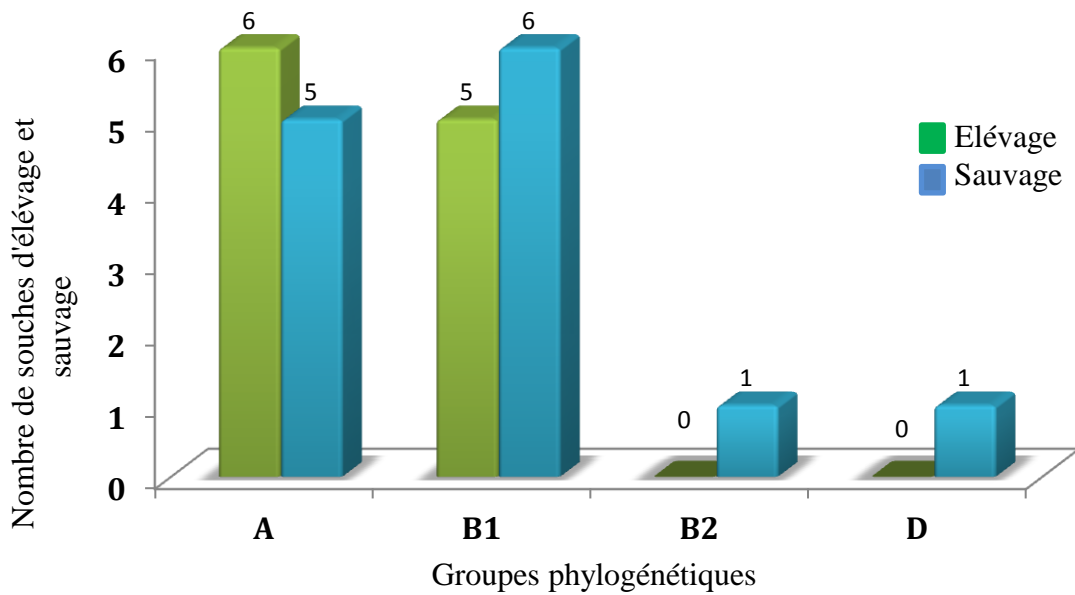


Figure 18: Les différents groupes phylogénétiques retrouvés chez les souches d'*E.coli* selon leur origine

Les résultats ont montré la prédominance des groupes A et B1 qui regroupent les souches commensales et environnementales comparé aux groupes D et B2 qui représentent les souches d'origine humaine ou animale et qui peuvent être très pathogènes (Abdul-Razzaq et Abdul-Lateef, 2011). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Duriez et *al.* (2001) qui a observé que le groupe B2 est rare parmi les isolats commensaux alors que les groupes A et B1 sont les plus communs. Certains rapports indiquent que des souches appartenant aux groupes A et B1 peuvent aussi causer des maladies de type extra-intestinales (Rijavec et *al.*, 2008).

Il a été signalé que les facteurs géographiques et climatiques pourraient affecter la répartition des groupes phylogénétiques d'*E. coli* commensales. La prévalence des isolats du groupe A chez les personnes dans les régions tempérées avait diminué de moitié chez les personnes dans les régions tropicales. Comme indiqué par Duriez et *al.* (2001), cette différence peut résulter de facteurs liés à l'environnement externe ou peut être dû à des différences culturelles dans le régime alimentaire ou de la transformation des aliments et les pratiques de préparation. Notamment, certains groupes phylogénétiques étaient absents dans certaines populations, comme les types B2 en Corée du Sud, les types de B1 au Japon, et des types D à Cotonou (Bénin, Afrique) (Abdul-Razzaq et Abdul-Lateef, 2011).

Ces données suggèrent une forte influence génétique sur la distribution des groupes phylogénétiques des souches d'*E. coli* commensales. Des facteurs tels que ceux mentionnés ci-dessus peuvent influencer la répartition des groupes phylogénétiques dans les isolats fécaux chez les humains.

D'après les études de phylogénie, le groupe B2 est le plus ancien et contient la plus haute diversité génétique. Il possède une structure clonale et neuf sous-groupes phylogénétiques. La prévalence du groupe B2 depuis les 20 dernières années, est en nette augmentation dans les flores des populations humaines des pays industrialisés et/ou au climat tempéré (Ramos, 2010).

En ce qui concerne la répartition des souches d'*E. coli* pathogènes au sein de l'arbre phylogénétique, nous retiendrons essentiellement que les souches pathogènes produisant des infections extra-intestinales (ExPEC) appartiennent principalement au groupe B2, et minoritairement au groupe D, mais à aucun autre groupe.

Le pathovar EPEC (*E. coli* entéro-pathogènes) est divisé en deux sous groupes EPEC1 et 2, qui appartiennent au groupe phylogénétique B1 et B2. Le pathovar ETEC (*E. coli* entéro-toxigénique) est distribuée dans les groupes A et B1 (Ramos, 2010).

Pupo *et al.* (1997) ont montré que les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), entéropathogènes (EPEC) et entérotoxinogènes (ETEC) étaient répartis en plusieurs lignées à l'intérieur des groupes Phylogénétiques A et B1. Le groupe B2 était relié aux souches responsables d'infections du tractus urinaire, bactériémies et méningites néonatales mais pas aux souches diarrhéiques. Les souches associées à une diarrhée chronique et légère sont distribuées un peu partout dans l'arbre phylogénétique (Ramos, 2010).

III.3 Relation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques

D'après la figure 19 nous avons constaté que les souches d'*E. coli* appartenant au groupe A (n=11) ont montré une résistance marquée à la tétracycline (TE) (n= 6) et à l'amoxicilline (AX) (n= 5), suivi par le triméthoprim (TMP) (n=3), l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole (SXT) (n=3), la Kanamycine (K) (n=3), les sulfamides (SSS) (n=2), l'acide nalidixique (NA) (n=2), la ciprofloxacine (CIP) (n=1), la pefloxacine (PEF) (n=1) et le chloramphénicol (C) (n= 1).

En ce qui concerne les souches d'*E.coli* appartenant au groupe B1 (n=11), nous avons remarqué une résistance élevée aux tétracyclines et aux sulfamides (n= 5), à l'amoxicilline (n=4), à l'acide nalidixique (n=4) et à la Kanamycine (n= 4). Trois souches ont été trouvées résistantes pour chacune des molécules : TMP, SXT et CIP, deux souches qui résistent à chacune de ces molécules ceftazidime (CAZ) et aztréonam (ATM), et qu'une seule souche a été résistante à la pefloxacin (PEF) (**Figure 20**)

Pour les deux autres groupes **B2** et **D**, les souches ont présenté une résistance aux 5 molécules suivantes : AX, SSS, TMP, SXT et TE.

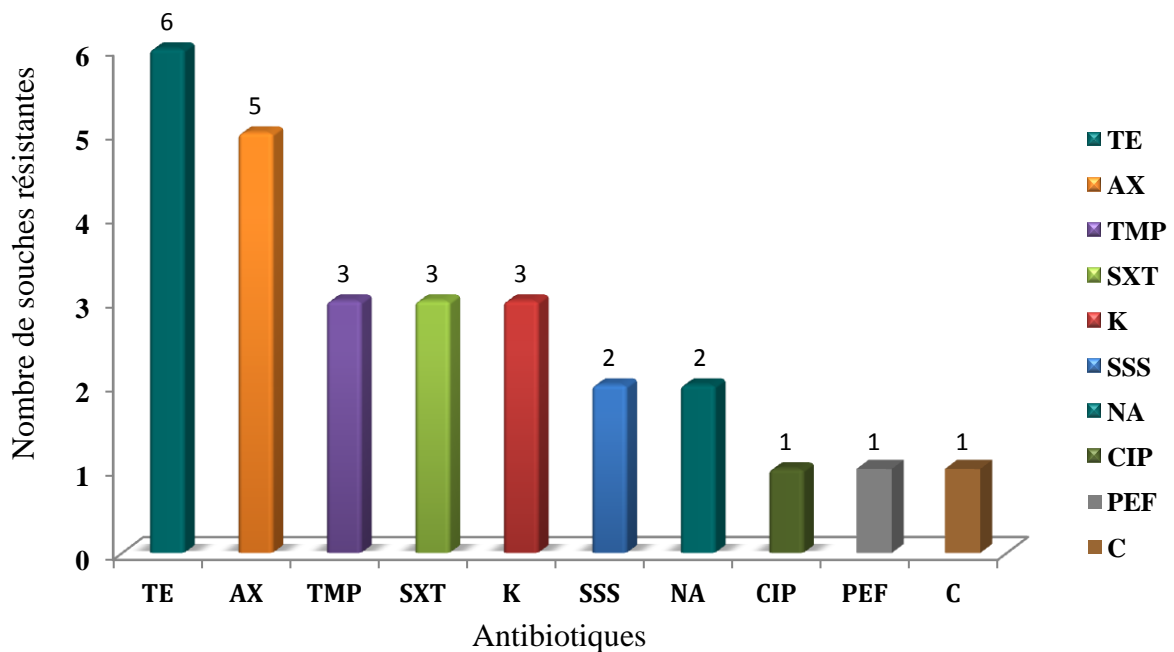


Figure 19 : Nombre de souches résistantes aux antibiotiques appartiennent au groupe A

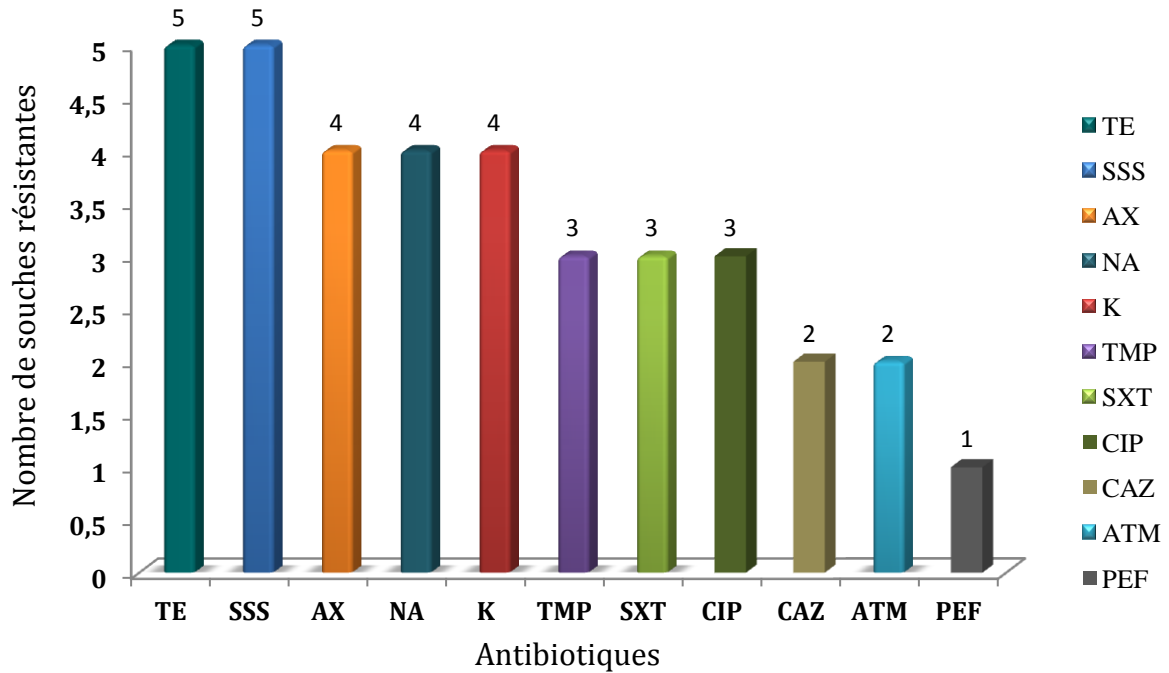


Figure 20 : Nombre de souches résistantes aux antibiotiques appartiennent au groupe B1

La figure 21 montre le niveau de multi-résistance des souches dans chaque groupe phylogénétique. Les résultats ont montré que la multi-résistance est entre 0-9 Pour le groupe A et de 0 à 8 Pour le groupe B1. Les souches des groupes D et B2 ont présenté une résistance à 5 molécules d’antibiotiques (**Tableau 6**)

Selon plusieurs études, les souches de phylogroupes B2 et D sont dites virulentes en se basant sur la présence de plusieurs gènes de virulence, ce contenu génétique représente un effet négatif sur le « fitness » ou la « compétitivité » de la bactérie récompensé par un faible pool génétique de résistance aux antibiotiques (Hakim et Hammami., 2010). De ce fait, les souches B2 et D sont généralement plus sensibles aux antibiotiques que les groupes A et B1, c’est ce qui a été constaté dans nos résultats.

Tableau 6 : Relation résistance aux antibiotiques-groupes phylogénétiques

Profil de résistance aux antibiotiques		Groupes phylogénétiques			
		A	B1	B2	D
A0	-	E2, E12, E18, S3	E7, S1, S4		
A1	TE	E1, E6			
	AX	S2	E13		
A2	AX- TE		S6		
	NA-TE		S22		
A3	AX-TE-C	S13			
	ATM-CAZ-SSS		E17		
A4	TMP-SXT-TE-K	S12			
A5	SSS-CIP-PEF-NA-K		E14		
	AX-SSS-TMP-SXT-TE			S9	
	AX-SSS-TMP-SXT-TE				S11
A7	AX-SSS-TMP-SXT-NA-TE-K	E11			
	AX-ATM-CAZ-SSS-TMP-SXT-K		S16		
A8	AX-SSS-TMP-SXT-CIP-NA-TE-K		E3-S7		
A9	AX-SSS-TMP-SXT-CIP-PEF-NA-TE-K	S21			

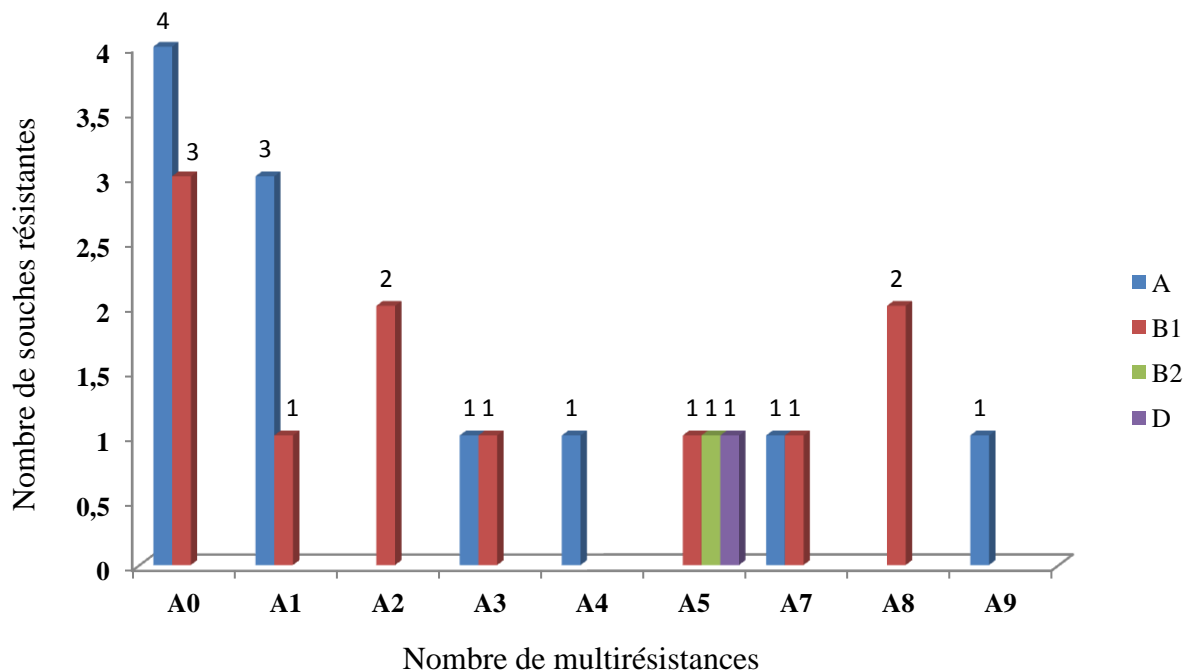


Figure 21 : Le nombre de multi-résistances chez les groupes phylogénétiques

La discussion des résultats de la recherche des gènes de bêta-lactamases par PCR obtenus lors du travail d'Alioui et Zebila (2013), en fonction des groupes phylogénétiques montre que parmi les souches d'*E.coli* appartenant au groupe phylogénétique A, nous retrouvons une souche (S2) productrice de la bêta-lactamase TEM, trois souches (S13, E11, E12) productrices de la bêta-lactamase SHV et une seule souche (S12) productrice de deux bêta-lactamases TEM et SHV, à la fois. Parmi les souches du groupe B1, une souche (S7) a été trouvée productrice de la bêta-lactamase TEM et deux autres souches (S16, S6) ont été trouvées productrices de la bêta-lactamase SHV. La souche appartenant au groupe B2 (S9) possédait le gène *bla_{SHV}*, alors que celle appartenant au groupe D (S11) possédait les deux gènes *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}* (**Tableau 7**). Actuellement, des relations entre le fond génétique des souches et leurs traits de virulence ainsi que leurs traits de résistance sont étudiés. Il a été décrit que chez *E.coli*, le gène *bla_{CTX-M}* a été retrouvé en association avec le groupe D et B2 (Branger et al., 2005). En Algérie, une *E.coli* CTX-M+ appartenant au groupe D a été détectée en 2009 au niveau de la plage de Ain Chrob pas loin de la ferme d'élevage étudiée dans ce travail (Alouache et al., 2012).

Ceci conforte notre hypothèse que ces *E.coli* résistantes retrouvées dans les moules sont d'origine anthropique. Plusieurs études ont également rapporté que les souches du groupe A et B1 soit des souches commensales et faiblement pathogènes pour la majorité, ils peuvent représenter un réservoir de gènes de résistance et favoriserait la dissémination de ce phénomène de résistance par les échanges génétiques. En effet, il a été décrit chez une souche du groupe A, cinq gènes de résistance (CTX-M-14, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-15 and CTX-M-32) (Oteo et al., 2009).

Tableau 7 : Tableau des souches avec les gènes présents

Groupe phylogénétique	Souches présentées	Les gènes présents
Groupe A	S2	TEM
	S13, E11, E12	SHV
	S12	TEM, SHV
Groupe B1	S7	TEM
	S16, S6	SHV
Groupe B2	S9	SHV
Groupe D	S11	TEM, SHV

Ces études sur la phylogénie des souches d'*E.coli* et sa relation avec la virulence et la résistance aux antibiotiques restent à leur début, il est très important d'avoir une image sur la flore commensale humaine et animale dans chaque région, suivre la prévalence et le maintien de ces différents groupes dans l'environnement afin de comprendre l'émergence et la dissémination de la virulence et de la résistance aux antibiotiques.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a été menée pour montrer la phylogénie des *E. coli* isolées à partir de la moule « *Mytilus galloprovincialis* » d'élevage et sauvage afin de déterminer les quatre principaux groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D), pour cela nous avons utilisé une méthode de PCR basée sur l'utilisation des marqueurs génétiques : *chua*, *yjaA* et *TspE4.C2*.

Dans ce travail les souches d'*E.coli* appartiennent en majorités (45.8%) au groupe A et B1 qui sont très proches et plus récents cela signifie que la source de la bactérie *E. coli* isolée est intestinale. Ces deux groupes sont les plus dominants chez les animaux et les plus répandues dans l'environnement.

Tandis que seulement deux souches d'*E.coli* isolées à partir de la moule sauvage (4.2%) appartiennent aux groupes B2 et D qui portent souvent des facteurs de virulence ce qui suggérerait que la source des isolats est extra-intestinale.

Malgré que ces souches soient de type commensal, il a été observé une multi-résistance des souches de type A et B1. De plus, certains de ces souches possédaient des gènes de bêta-lactamases, ce qui corrobore les données de la littérature.

En perspective à cette étude, il serait intéressant de continuer le suivi des populations d'*E.coli* dans l'environnement et étudier leur potentiel de virulence.

Bibliographie

Références bibliographiques

A

Abdul-Razzaq M.S. et Abdul-Lateef L.A., (2011) Molecular phylogeny of *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Hilla, department of Microbiology, College of Medicine, Babylon University, Iraq. 61p.

Alioui I. et Zebila I., (2013) Evaluation et caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez des coliformes isolés à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Thèse d'ingénieur (option: aquaculture). ENSSMAL. 45p.

Alouache S., Kada M., Messai Y., Estepa V., Torres C. et Bakour R., (2012) Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in Isolated Bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes. Environ* **27**: 80-86.

Amara M. et Ameur Z., (2011) Contribution à la maîtrise de l'élevage larvaire du mollusque bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Thèse d'ingénieur (option: aquaculture). ENSSMAL. 61p.

B

Bergan T., (1984) Classification of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.*, 14, 1-41.

Bernier C., Gounon P. et Le Bouguéneq C., (2002) Identification of an aggregative fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect. Immun.*, 70: 4302-4311.

Bettelheim k.A., (1994) Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 3-30.

Boiuch N. et Radja B., (2012) Contrôle de la qualité microbiologique et toxicologique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) de Bordj El Kiffan bateau cassé, et de la ferme ORCA marine (Ain Chrob). Thèse d'Ingénieur (option: aquaculture). ENSSMAL. 43p.

Bonacorsi S.P., Clermont O., Houduoin V., Cordevant C., Brahim N., Marecat A., Tinsley C., Nassif X., Lange M. et Bingen E., (2003) Molecular analysis and experimental virulence of french and north american *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates ; Identification of new virulent clone. J Infect Dis 187:1895-906.

Boughachiche Z. et SI Abdallah Ch., (2011) Contribution à la détermination de la qualité microbiologique des moules produites dans une ferme aquacole d'Algérie. Thèse d'ingénieur (option : aquaculture). ENSSMAL. 57p.

Boujema A. et Ourari S., (2005) Contribution à l'étude des éléments techniques des fonctionnements du centre conchylicole pilote du CNDRPA. Thèse d'ingénieur (option : aquaculture). ISMAL.51p.

Bouvier M., (2011) Mise au point de méthodes de détection des souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC). Thèse pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. École Pratique des Hautes Etudes Sciences de la Vie et de la Terre. France. 46p.

Brenner D., Fanning G., Miklos G. et Steigerwalt A., (1972) Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. Int J Syst Bacteriol. 23: 1-7.

Brenner D.J., (1984) Facultatively anaerobic Gram-negative rods. Family I: *Enterobacteriaceae*. In: Krieg N.R., Holt J.G. (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1. Williams and Wilkins: Baltimore, 408-420.

Branger C., Zamfir O., Geoffroy S., Laurans G. et Arle G., (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. Emerg. Infect.Dis. 11: 54–61.

Brisou J., Vargues H. et Cadeillan J., (1962) La contamination bactérienne des moules de la baie d'Alger. Arch. Institut. Pasteur d'Alger. 210-219 P.

C

Castellani A. et Chalmers A.J., (1919) Manual of tropical medicine, 3rd ed. Williams, Wood and Co. New York. Type genus: Bacteroides.

CCME., (1999) Canadian environmental quality guidelines. Technical report, Canadian Council of Ministers of the Environment.

Cerbom., (1964) Pollution marine par les micro-organismes et les produits pétroliers. Symposium de Monaco.

Clermont O., Bonacorsi S. et Bingen E., (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol 66: 4555-4558.

Characklis G., Dilts M., Simmons O., Likirdopulos C., Krometis L. et Sobsey M., (2005) Microbial partitioning to settleable particles in stormwater. Water Research, 39(9):1773–1782.

Cooke E.M., (1985) *Escherichia coli*: an overview. J. Hyg. Cambr., 95, 523-530.

Croxen M.A. et Finlay B.B., (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol 8: 26-38.

D

Derjaguin B. et Landau L., (1993) Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. Progress in Surface Science, 43(1-4) :30 – 59.

Djediat C., (1993) Etude histo-physiologique et ultra structurale de la gonade femelle de *Mytilus galloprovincialis* LMK, Mollusque bivalve lamellibranche. Estimation de la maturité sexuelle de la population. Thèse de Magister histo-cytologie (option biologie marine) ; ISN, USTHB Alger. 90p.

Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U. et Hacker J., (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat Rev Microbiol 2: 414-424.

Ducruet J., (2000) Organisation d'un lamellibranche : la moule. Université Claude Bernard Lyon I. Lab.d'Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, enseignement de Biologie des Organismes Animaux du Deug Science de la Vie et de l'Univers.

Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventre´ A., Elion J., Picard B. et Denamur E., (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human population. *Microbiol.* 147: 1671-1676.

E

Enright M.C. et Spratt B.G., (1999) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 7: 482-487.

Escobar-Páramo P., Clermont O., Blanc-Potard A., Bui H., Le Bouguenec C. et Denamur E., (2004a) A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 21:1085-1094.

Escobar-Páramo P., Grenet K., Le Menac’h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., RahimyM.C., Andremont A., Denamur E. et Ruimy R., (2004b) Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 70 : 5698-5700.

F

FAO., (2006) la situation mondiale des pêches et de l'aquaculture département des pêches et de l'aquaculture de la FAO. 180p.

FAO., (2010) la situation mondiale des pêches et de l'aquaculture département des pêches et de l'aquaculture de la FAO. 223p.

G

Garcia-Armisen T. et Servais P., (2009) Partitioning and fate of particle-associated *E. coli* in river waters. *Water Environment Research*, 81(1): 21 – 28.

Gordon D.M., Clermont O., Tolley H. et Denamur E., (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10: 2484-2496.

Guignot J. et Servin A., (2006) *Escherichia coli* entéro-virulents : récentes avancées. *Bull. Soc. Fr. Microbiol* 21: 263-276.

Guillaud J.F. et Romana A., (1996) La mer et les rejets urbains. 243p.

H

Hakim I. et Hammami M., (2010) *Escherichia coli* isolées de volailles: Profil de résistance aux antibiotiques et phylogroupes. Thèse de la Licence (option: Génie cellulaire) Institut de la Recherche Vétérinaire. Tunisie.51p.

Haouchine M., (1995) Ecologie et biologie de la reproduction de la moule M.G (LMK) au sein d'un système lagunaire saumâtre lac EL-MELAH. Thèse de Magistère ISN, USTHB Alger. 56p.

Helm M., Bourne N. et Lovatelli A., (2006) (comp. /éd.) Ecloserie de bivalves. Un manuel pratique. FAO Document technique sur les pêches. No. 471. Rome, FAO. 2006. 184p.

Hoorfar J., Cook N., Malorny B., Wagner M., De Medici D., Abdulmawjood A. et Fach P., (2004) Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. J Appl Microbiol 96, 221-222.

J

Jamieson R., Gordon R., Joy D.M. et Lee H., (2004) Assessing microbial pollution of rural surface waters: A review of current watershed scale modeling approaches. Agricultural Water Management, 70(1):1 – 17.

Jaureguy F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., Carbonnelle E., Lortholary O., Clermont O., Denamur E., Picard B., Nassif X. et Brisse S., (2008) Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics 9: 560.

Jeng H., England A. et Bradford H., (2005) Indicator organisms associated with stormwater suspended particles and estuarine sediment. Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 40(4): 779–791.

Johnson J.R., O'Bryan T.T., Low D.A., Ling G., Delavari P., Fasching C., Russo T.A., Carlino U. et Stell A.L., (2000) Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. Infect. Immun., 68, 3327-3336.

K

Kaeckenbeeck A., (1993) Le diagnostic des souches pathogènes d'*Escherichia coli* : petites et grande histoires. Ann. Méd. Vét., **137**, 337-340.

Kaper J.B., Nataro J.P. et Mobley H.L., (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2: 123-140.

Kauffmann F., (1947) The serology of the coli group. J. Immunol., 1947, 57, 71-100.

Krometis L.-A.H., Characklis G.W., Simmons O.D., Dilts M.J., Likirdopoulos C.A. et Sobsey M.D., (2007) Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. Water Research, 41(2): 506–16.

L

Lecointre G., Rachdi L., Darlu P. et Denamur E., (1998) *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol Biol Evol 15: 1685-1695.

Levine M., (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. Journal of Infectious Diseases 155:377-389.

Lior H., (1994) Classification of *Escherichia coli*. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 31-72.

Lubet P., (1959) Recherche sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinides (Moll. Bival). Rev. Trav. Inst. Pêche Marit 23 (4). p : 389-548.

M

MA. 700 – Ecct. 1.0, Rév. 1., (2009) Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 9 p.

Mainil J., (1993) Les colibacillooses dans l'espèce bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 137, 343-350.

Mainil J., (2003) Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives. 126p.

Manges A.R., Johnson J.R., Foxman B., O'Bryan T.T., Fullerton K.E., et Riley L.W., (2001) Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med*, 345:1007-1013

Marteil L., (1976) La conchyliculture française ; 2^{ème} partie : Biologie de l'huitre et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêches maritimes*, 40(2) p: 149-346.

Merbah S., (2009) Contribution à l'étude de la dynamique de population de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) et de sa faune associée, sur filières mytilicoles (Wilaya de Tipaza). Thèse de Magister (option: Océanographie Biologique et Environnement Marin) ; ISN, USTHB Alger. 73p.

Minor L. et Richard C., (1993) Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries. Institut Pasteur, Paris.

Miquel S., (2010) Facteurs de virulence d'*Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn : caractérisation et régulation de leur expression. Thèse du Doctorat (option Microbiologie); Université d'Auvergne France. 181p

M.P.R.H., (2001) Guide de l'aquaculture, 27p.

Montet M-P., (2009) Contamination des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France, et importance de l'acido-résistance des souches. Thèse du Doctorat (option: Systèmes intégrés, Environnement et Biodiversité). École Pratique des Hautes Études. 72p.

N

Nataro J.P. et Kaper J.B., (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11:142-201.

O

Ochman H. et Wilson A.C., (1987) Evolution in bacteria: evidence for an universal substitution rate in cellular genomes. J Mol Evol, 26: 74-86.

Orskov F. et Orskov I., (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. Methods Microbiol., 14, 43-112.

Orskov F. et Orskov I., (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can. J. Microbiol., 38, 699-704.

Oteo et al., (2009) Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. International Journal of Antimicrobial Agents Volume 34, Issue 2, August 2009, Pages 173–176

P

Picard B. et al., (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect Immun 67, 546-53.

Pohl P., (1993) Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. Annales de médecine vétérinaire 137:325-333.

Pupo G.M., Karaolis D.K., Lan R. et Reeves P.R., (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies.

R

Ramos G.C., (2010) Effets génotoxiques des souches d'*Escherichia coli* produisant la Colibactine. Thèse pour l'obtention du diplôme du doctorat de l'université de Toulouse. France. 123p.

Rijavec M., Muller-Premier M., Zakotnik B. et Žgur-Bertok D., (2008) Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. J. Med. Microbiol. 57: 1329-1334.

S

Savoie F., (2011) Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* Producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments. Thèse du Doctorat (option microbiologie) Université de Bourgogne. 197p.

Sojka w.J., (1965) *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Part I: General characteristics and biochemical behavior of *Escherichia coli*. Commonwealth Agricultural Bureaux: Farnham Royal, 1-63.

Sussman M., (1997) *Escherichia coli* and human disease. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge University Press: Cambridge, 348.

U

USEPA., (2001) Protocol for Developing Pathogen TMDLs. Technical report, U. S. Environmental Protection Agency.

V

Vergeynst L., (2010) Méthodes pour la mesure et la modélisation d'*Escherichia coli* dans les bassins d'orage. Thèse pour l'obtention du grade de Maîtrise en sciences en bio-ingénierie : gestion environnementale. Université Gent. 138p.

Vivares C., (1991) Consommer les coquillages est-il dangereux ? .Contamination, surveillance et santé publique. La recherche 2 28 janvier 1991.

Volume 22, 120-128p.

Volume 1, 565p.

Volume 13, 191p.

Volume. 2, 540p.

W

Welch R.A., Burland V., Plunkett G., Redford P., Roesch P., Rasko D., Buckles E.L., Liou S.R., Boutin A., Hackett J., Stroud D., Mayhew G.F., Rose D.J., Zhou S., Schwartz D.C., Perna N.T., Mobley H.L., Donnenberg M.S. et Blattner F.R., (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 17020-17024.

Westermeier R., (1997) Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation, VCH, Weinheim.

Wray C. et Woodward M.J., (1997) *Escherichia coli* infections in farm animals. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge University Press: Cambridge, 49-84.

Site internet

<http://aem.asm.org/content/76/19/6698.full>

<http://www.cns.fr>

<http://ecologie.blog.lemonde.fr>

<http://www.futura-sciences.com>

<http://www.globepharma.org>

<http://www.oeil.nc/fr>

Ifremer., (2006) <http://wwz.ifremer.fr/aquaculture/conchyliculture/>

Lars-Ove-Loo., (2000) Aquascope .T jamo Marine Biological Laboratory. Stomstad. Suede

<http://www.safewater.org>

<http://www.steakexpert.fr/Qu-est-ce-qu-un-STEC.html>

<http://www.zipcodezoo.com>