

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  
Ecole 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  
DE MASTER EN SCIENCES DE LA MER

## Thème

*Phylogénie des souches d'E. coli résistantes aux  
fluoroquinolones isolées au niveau de la station  
d'épuration de Boumerdes.*

Présenté par :

- BELKAID Hamza

Soutenu le 23 / 10 /2013 devant le jury suivant :

-M <sup>me</sup> MAUEL Dj.	Maitre assistante A	Présidente (ENSSMAL)
- M <sup>elle</sup> ALOUACHE S.	Maitre de conférences B	Promotrice (ENSSMAL)
-M <sup>me</sup> AMAR I.	Maitre assistante A	Examinatrice (ENSSMAL)
-M <sup>me</sup> LARIBI H.	Maitre de conférences B	Examinatrice (UNIVERSITE DE BLIDA)

Promotion : 2012/2013

## *Remerciements*

*Je tiens en premier lieu à remercier « Allah » de m'avoir donné la force et le courage jusqu'à l'aboutissement de mes études, et l'accomplissement de ce modeste travail.*

*À M<sup>elle</sup> ALOUACHE.S, maitre de conférences B à l'ENSSMAL et membre du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (équipe de génétique) à USTHB, ma promotrice. J'ai eu le privilège de bénéficier de ses conseils précieux, de son écoute permanente et surtout de sa patience. Je suis reconnaissant de la confiance qu'elle m'a accordée et des discussions enrichissantes que j'ai eues. Je tiens à lui assurer toute mon admiration et mon respect.*

*À M<sup>me</sup> Mauel .Dj, maitre assistante A à l'ENSSMAL. Je suis très sensible à l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Qu'il reçoive ici le témoignage de mon profonde reconnaissance.*

*À M<sup>me</sup> AMAR.I, maitre assistante A à l'ENSSMAL et à M<sup>me</sup> LARIBI.H, maitre de conférences B à l'UNIVERSITE de BLIDA je les remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que membres de jury. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma respectueuse gratitude.*

*J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à M<sup>me</sup> REFES N. et M<sup>r</sup> MATOUK Y. qui m'a apporté beaucoup d'aide durant mon stage pratique. Je n'oublie pas de remercier toutes les personnes au niveau de laboratoire de génétique à l'USTHB, qui m'a tous si bien accueilli et aimablement aidé.*

*Mes remerciements s'étendent également A :*

*Mes parents, mes frères et sœurs pour leur soutien durant toutes ces années d'études.*

*À tous mes ami(e)s passés et présents, qui m'ont donné toute leur amitié et leur soutien et à tous nos enseignants que nous avons eus durant les années des études.*

*Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes chaire parents de m'avoir donné l'aide et la confiance*

*A mes frères*

*A mes sœurs*

*A mes nièces et mes neveux*

*A tous mes amis*

*A tous les personnes qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de cette  
année*

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> <i>E.coli</i> au microscope électronique.....	3
<b>Figure 2:</b> structure de <i>E.coli</i> .....	5
<b>Figure 3:</b> structure de la membrane d' <i>E.coli</i> .....	6
<b>Figure 4:</b> Classifications des pathotypes d' <i>E.coli</i> .....	11
<b>Figure 5:</b> Mécanismes d'interaction des différents pathotypes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées.....	12
<b>Figure 6:</b> Arbre phylogénétique des <i>E. coli</i> .....	14
<b>Figure 7:</b> Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches de <i>E.coli</i> par amplification génique (PCR).....	15
<b>Figure 8:</b> l'arbre phylogénétique de <i>E.coli</i> .....	16
<b>Figure 9:</b> Photo satellitaire de la station d'épuration de BOUMERDES.....	17
<b>Figure 10:</b> Schéma de la disposition des antibiotiques.....	23
<b>Figure 11:</b> illustration de la présence du gène <i>ChuA</i> chez les souches d' <i>E.coli</i> .....	26
<b>Figure 12:</b> illustration de la présence du gène <i>YjA</i> chez les souches d' <i>E.coli</i> .....	27
<b>Figure 13:</b> illustration de la présence du gène <i>TSPE4C</i> chez les souches d' <i>E.coli</i> .....	28
<b>Figure 14:</b> distribution des groupes phylogénétiques des 28 souches d' <i>E.coli</i> .....	30
<b>Figure 15:</b> distribution des groupes phylogénétiques dans les eaux usées .....	30
<b>Figure 16:</b> distribution des groupes phylogénétiques dans les eaux traitées.....	31
<b>Figure 17:</b> distribution des souches en fonction de leur antibiotype.....	33
<b>Figure 18:</b> distribution des nombres de résistance avant et après traitement.....	33
<b>Figure 19:</b> Résistance des 14 souches du groupe <b>A</b> vis-à-vis des antibiotiques.....	34
<b>Figure 20:</b> taux de résistance des 10 souches du groupe <b>B1</b> vis-à-vis des antibiotiques	35
<b>Figure 21:</b> taux de résistance des 2 souches du groupe <b>D</b> aux antibiotiques.....	35
<b>Figure 22:</b> taux de résistance des 2 souches de groupe <b>B2</b> vis-à-vis les antibiotiques	36
<b>Figure 23:</b> comparaison des taux de résistances vis-à-vis des antibiotiques des souches des groupes A+B1 avant (n= 15) et après (n= 9) traitement.....	37

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> liste des amorces utilisées pour la détermination de la phylogénie d' <i>E.coli</i> .....	<b>21</b>
<b>Tableau 2:</b> Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.....	<b>24</b>
<b>Tableau 3:</b> Distribution des souches <i>E.coli</i> isolées selon les groupes phylogénétiques.....	<b>29</b>
<b>Tableau 4:</b> Profils d'antibiorésistance des 28 souches résistantes au ciprofloxacine....	<b>32</b>

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. GENERALITE</b> .....	<b>3</b>
I.1. Caractères biochimique et culturaux.....	3
I.2. Caractères antigéniques.....	4
I.2.1. Les antigènes somatiques O.....	4
I.2.2. Les antigènes flagellaires H.....	4
I.2.3. Les antigènes de surface ou d'enveloppe K.....	5
I.3. Taxonomie.....	6
I.4. Le génome d' <i>E. coli</i> .....	7
I.5. Subdivisions de l'espèce <i>E. coli</i> .....	7
I.6. Commensalisme et pathogénicité de <i>E.coli</i> .....	8
I.6.1. La notion de pathotype.....	8
I.6.2. Classification des pathotypes d' <i>E. coli</i> .....	9
I.7. Habitat et écologie.....	12
I.8. La phylogénie de <i>E.coli</i> .....	13
I.8.1. Les groupes phylogéniques.....	15
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>17</b>
II.1. Présentation du site.....	17
II.2. prélèvement et sélection des souches résistantes aux quinolones .....	18
II.3. méthodes.....	18
II.3.1-Identification.....	18
II.3-2-Phylogenie.....	19
II.3.2.1. Extraction de l'ADN.....	20
II.3.2.2. Détermination des groupes phylogénétiques par PCR .....	20
II.3.3. Antibiogramme.....	22
<b>III. RESULTATATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>25</b>
III.1. Identification Bactérienne.....	25

III.2. Phylogénie des souches d' <i>E. coli</i> résistantes aux quinolones.....	25
III.2.1. Recherche du gène <i>chuA</i> .....	25
III.2.2. Recherche du gène <i>YjaA</i> .....	25
III.2.3. Recherche de TspE4.C2.....	26
III.3.4. Détermination des groupes phylogénétiques.....	30
III. 3.Profils d'antibiorésistance des souches résistantes au ciprofloxacine.	31
III.4. Association de la multirésistance et le fond génétique des souches...	34
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>38</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>41</b>
<b>ANNEXE</b>	

# *Introduction*

## INTRODUCTION

Parmi les cinq mille espèces bactériennes décrites à ce jour, une à deux centaines seulement sont susceptibles de déclencher des maladies chez l'homme. Pour certaines d'entre elles, la dose infectante est très faible (quelques cellules) et témoigne de leur extrême virulence. Ces agents infectieux possèdent des attributs qui, globalement, leur permettent de coloniser l'homme en déjouant, la plus part du temps ses défenses.

Les circonstances d'émergence, au sein du monde microbien, d'organismes pourvus de telles armes sont encore obscures. Bactérie versatile, *Escherichia coli* est un modèle exemplaire dans l'appréhension de cette énigme (**Collyne et Simonet. 2006**).

*E. coli* colonise le tractus gastro-intestinal de l'homme dès les premières heures suivant la naissance et persiste dans le colon pratiquement toute la vie. Ce microorganisme représente le prototype de l'espèce commensale anaérobie facultative de ce segment du tube digestif et assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse (**Kaper et al., 2004**).

Plus d'un siècle après les études pionnières de la flore intestinale humaine menant Theodor Escherich à la découverte de *Bacterium coli* (l'appellation initiale de *E. coli*), on ignore encore les bases moléculaires du microorganisme qui président à son implantation dans cette niche. Exception faite d'un état d'immunodépression ou d'une brèche intestinale chez l'hôte, les souches commensales d'*E. coli* ne provoquent pas des maladies humaines. Cependant, des désordres intestinaux peuvent être induits par des variants, observation déjà rapportées en son temps par Theodor Escherich (**Thomas et Neilsen. 2005**).

Afin d'obtenir la meilleure compréhension du rôle des commensaux dans l'acquisition et l'entretien de divers gènes de virulence, des études ont montré la corrélation entre le fond génétique et le potentiel de virulence de ces souches (**Katarzyna et al., 2008**).

L'analyse phylogénétique de l'espèce *E. coli* a révélé que la majorité des souches appartiennent à quatre phylogénétiques groupes: A, B1, D et B2. Les souches commensales appartiennent aux groupes A et B1, alors que les souches pathogènes (extra-intestinales *E. coli*) appartiennent principalement aux groupes D et B2 (**Katarzyna et al., 2008**).

Durant le processus du traitement des eaux usées, des changements qualitatifs et quantitatifs dans la distribution des populations bactériennes sont observés.

Ces modifications ont pour conséquence la réduction de la charge microbienne dont la population résistante et pathogène. Cependant, plusieurs études ont rapporté la présence de bactéries résistantes dans les eaux usées traitées (**Guardabassi et al., 2002**). La station d'épuration des eaux usées est un intermédiaire entre les activités humaines et l'environnement, et est un compartiment favorable pour le maintien et la dissémination de la résistance par la pression de sélection exercée par les différentes molécules (antibiotiques, métaux lourds, désinfectants...etc) ainsi que les échanges génétiques favorisés à l'intérieur des biofilms (10 à 600 fois plus de transfert). Ces derniers deviendraient propices à l'émergence de nouveaux pathogènes par l'acquisition des gènes de résistances, de facteurs de virulence et de capacités à la survie environnementale (**Watnick et Kolter ; 2000**).

Les systèmes d'épuration des eaux usées rejettent à des concentrations variables des bactéries d'origine entérique dans l'environnement. Le devenir de ces rejets dans le milieu récepteur peut revêtir une importance sanitaire dans le cas du milieu littoral, puisque les activités de baignade, et surtout de conchyliculture sont menacées par une contamination bactérienne d'origine fécale (**Dupray et Derrien, 1994**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de projet de recherche sur l'évaluation de la virulence et résistance aux antibiotiques des souches à Gram négatif isolées à partir des milieux aquatiques. Il complète une étude entamée en 2010. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la détermination des groupes phylogénétiques des souches d'E.coli isolées à partir des eaux usées et eaux traitées au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines de Boumerdes.

Pour réaliser ce travail nous avons adopté le plan suivant :

- Confirmation de la résistance aux fluoroquinolones.
- Identification des bactéries résistantes.
- Détermination des groupes phylogénétiques par PCR.
- Evaluation de la résistance des souches aux antibiotiques par antibiogramme.

# *Généralités*

## I.GENERALITE

*E. coli* est un bacille gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent la naissance. *E. coli* constitue alors tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie intestinale (Sylvie M. 2010). *E. coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour : en effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un outil d'étude de choix.

### I.1. Caractères biochimique et cultureux

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µ de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche (Figure1). Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes (Figure 2) (Lobril , 1998).

*E. coli* est mesophile avec une température de croissance, comprise entre 15°C et 45°C avec un optimum à 37°C. Sa culture admet une grande tolérance de variation de pH et le pH optimum est de 7,5 (McMath et Holt, 2000).

*E.coli* possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. Ils ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S. Ils sont aérobie- anaérobie facultatifs, capables de fermenter le glucose, le lactose et le mannitol avec production importante de gaz au bout de 24-48H. Ils réduisent les nitrates en nitrites et dégradent le tryptophane en indole. Ils sont incapables d'utiliser le citrate comme seul source de carbone (Flaudrois , 2004). Les souches sauvage d'E.coli restent relativement sensibles aux antibiotiques (McMath et Holt, 2000).

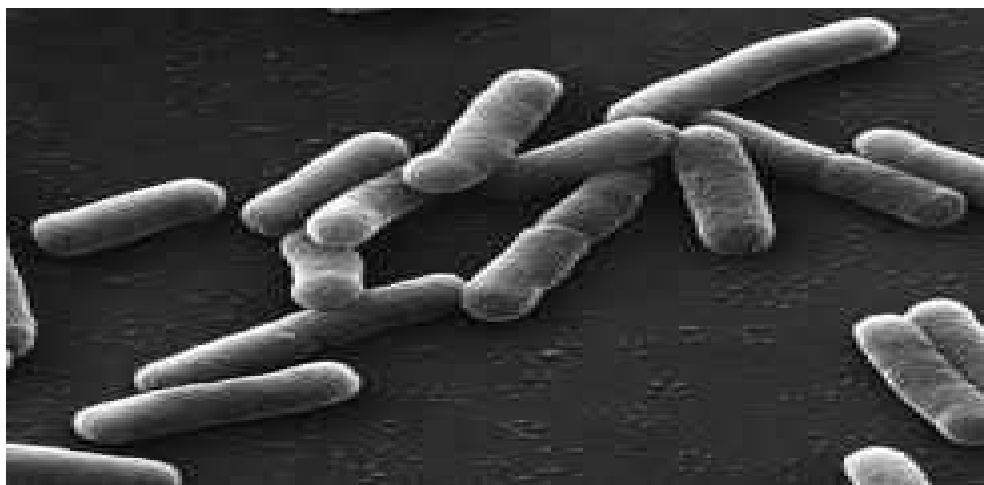


Figure 1: *E.coli* au microscope électronique (Stordeur et al., 2002)

## I.2. Caractères antigéniques

Au sein de chaque genre, on individualise les espèces par l'étude des caractères biochimiques et antigéniques. Les *E. coli* sont caractérisés, en routine, par l'identification sérologique de leurs antigènes somatiques O, flagellaires H et capsulaires K.

### I.2.1. Les antigènes somatiques O :

Les antigènes somatiques sont composés de lipopolysaccharides complexes. Actuellement certains laboratoires d'analyses médicales utilisent l'agglutination avec des sérums pour déterminer le sérotype, mais cette technique est limitée par le nombre de plus en plus élevé de sérums à fabriquer, par la présence d'agglutinations croisées entre les antigènes O d' *E. coli*, *Shigella* et ceux de *Salmonella*, et par le passage de la consistance crémeuse de la colonie à une consistance rugueuse ayant pour conséquence l'absence de synthèse de l'antigène O. C'est pour cette raison qu'une technique de sérotypage moléculaire a été développée.

L'antigène O fait partie du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries à gram négatif. Il contient un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides de 3 à 6 sucres dont la combinaison détermine la diversité des antigènes O.

### I.2.2. Les antigènes flagellaires H

La diversité des antigènes H est due aux différents types de flagelline composant la structure du flagelle. C'est le flagelle qui permet la mobilité bactérienne. Le typage s'effectue également par séro-agglutination, mais n'est développé que dans de très rares laboratoires dans le monde. Cependant, certaines souches perdent leur mobilité et sont classées comme non mobile (NM ou H-). Une technique de sérotypage moléculaire a donc été également développée pour déterminer l'antigène H (**Zhang et al., 2000 ; Coimbra et al., 2000**).

L'antigène H est codé par le gène *fliC*. Les parties N et C terminales de la flagelline sont très conservés et c'est la partie médiane, plus variable, qui donne la spécificité de l'antigène H. Les *E. coli* immobiles possèdent également le gène *fliC* mais sont incapables de synthétiser un flagelle fonctionnel. Après amplification et restriction du gène *fliC*, il est possible de typer l'antigène H en comparant le profil obtenu à une base de données de profil-type (**Machado et al., 2000**).

### I.2.3. Les antigènes de surface ou d'enveloppe K

Il existe 3 types d'antigène K désignés par les lettres L, A ou B.

- L'Ag L est le plus fréquent mais est thermolabile (il est détruit en une demi heure à 100°C). Donc le chauffage provoque une perte du pouvoir antigénique, du pouvoir de fixer les agglutinines et du pouvoir de masquer l'Ag O.
- L'Ag A est rare ; c'est un Ag capsulaire, très thermostable
- L'Ag B est toujours présent chez les *E. coli* enthéropathogènes de GEI (gastro-entérite infantile). Il a une thermolabilité intermédiaire : après ½ h. à 100°C (Sylvie M. 2010).

Il existe près de 200 antigènes O décrits, près de 70 antigènes K et environ 60 antigènes H. Les différentes combinaisons de ces trois types d'antigènes forment les différentes souches d'*E. coli* qui auront des propriétés générales et pathogènes différentes les unes des autres. Par exemple, la souche O157:H7 est une souche pathogène observée pour la première fois à la fin des années 1970. Bien que les antigènes de la souche O104:H4 on été décrit avant ceux de la souche O157:H7, la pathogénicité de la souche n'a été observée qu'en 2010, lors de l'épidémie qui a sévi en Allemagne (Vieira, 2011).

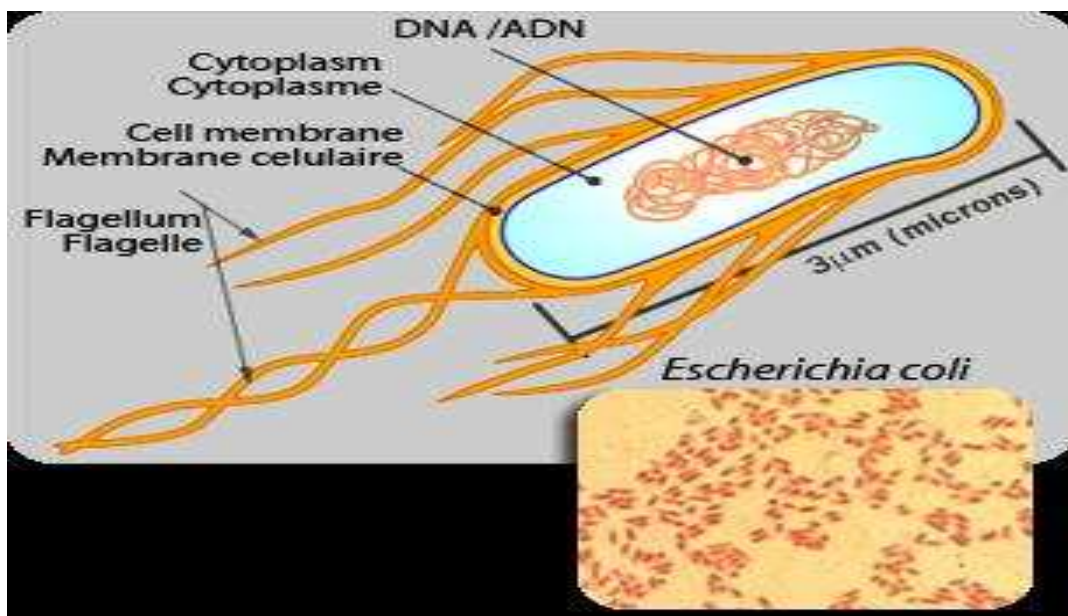
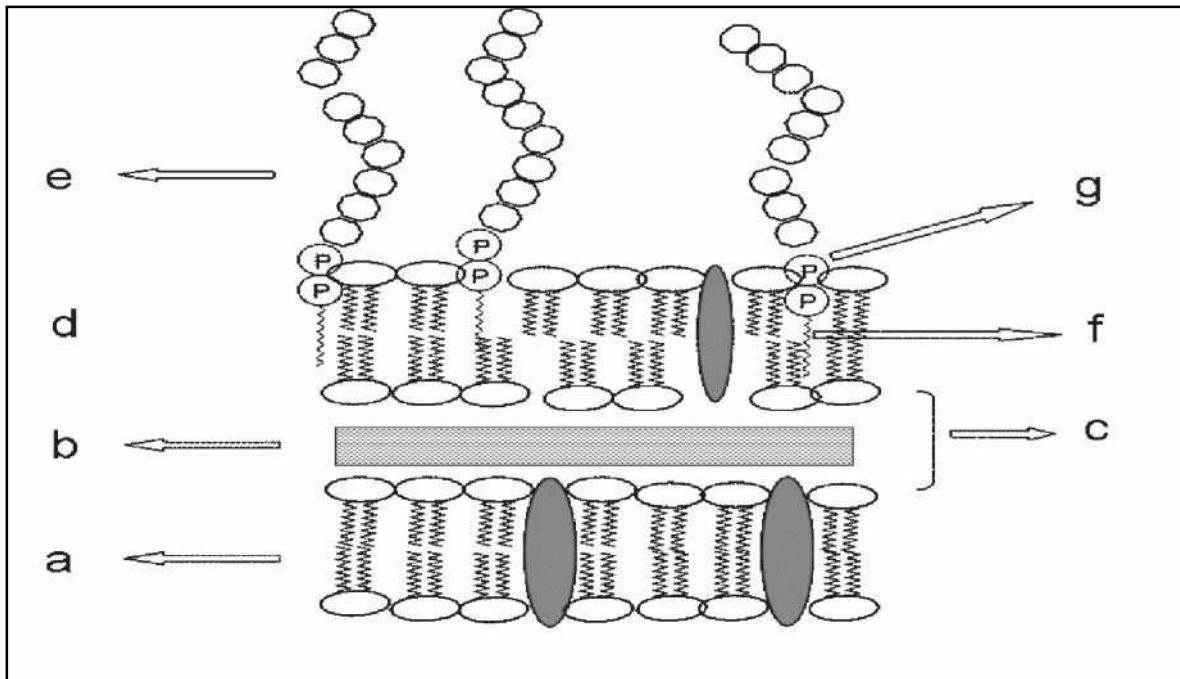


Figure 2: structure de *E. coli* (Lobril, 1998).



**Figure 3:** structure de la membrane d' *E.coli* (Szalo et al., 2006).

a – la membrane cytoplasmique ; b – la couche du peptidoglycane ; c – l'espace périplasmique ; d – la membrane externe ; e – l'antigène O ; f – le lipide A ; g – le noyau

### I.3. Taxonomie

Voici la systématique du colibacille bien connu, ou *Escherichia coli* :

- règne : *Procaryotae*
- domaine : *Bacteria*
- *phylum* : *Proteobacteria*
- classe : *Gammaproteobacteria*
- ordre : *Enterobacteriales*
- famille : *Enterobacteriaceae*
- genre : *Escherichia*
- espèce : *Escherichia coli*

### **I.4. Le génome d' *E. coli*.**

Le patrimoine génétique de la souche *E. coli* de laboratoire non pathogène a été entièrement séquencé en 1997. Son génome comprend 4,6 millions de paires de bases codant environ 4200 protéines.

En 2001, le génome d'une souche d' *E. coli* entérohémorragique (provoquant la maladie du hamburger) a été séquencé. Il comprend 5,5 millions de paires de bases codant 5400 protéines. L'année suivante, le génome d'une souche d' *E. coli* provoquant des infections urinaires (cystite, pyélonéphrite) et des méningites néonatales, a été séquencé. Il comprend 5,2 millions de paires de bases codant 5300 protéines.

La comparaison des génomes de ces trois souches d' *E. coli* révèle que seulement 40% de leurs gènes sont communs. A titre de comparaison, 99% des gènes de l'homme et des grands singes sont communs. Ceci témoigne du remarquable potentiel évolutif et de la versatilité de ce taxon bactérien. En effet, les souches d' *E. coli* pathogènes ont acquis au cours de l'évolution un répertoire de gènes de virulence, qui leur permettent de coloniser de nouvelles niches écologiques en contournant les mécanismes de défense de l'hôte. L'expression d'un répertoire spécifique de facteurs de virulence est corrélée à une pathologie particulière et permet de définir différents pathovars (**RAY et RAET, 2000**).

### **I.5. 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.

**-Le BIOTYPE :** est le profil biochimique des souches. A côté des caractères d'espèce, les souches d' *E. coli* varient, en effet, par différents autres caractères biochimiques (**MAINIL J, 2003**)

**-Le SEROTYPE :** est défini par la combinaison de certains antigènes de surface que l'on peut mettre en évidence : les antigènes somatiques de nature lipopolysaccharidique (LPS), les antigènes capsulaires K de nature polysaccharidique et les antigènes ciliaires H de nature protéique (**MAINIL J, 2003**)

Les bases du schéma d'identification par sérotypie ont été définies par Kauffmann. Actuellement, environ 180 groupes O, 80 groupes K et 70 groupes H ont été reconnus (**MAINIL J, 2003**)

-Le **LYSOTYPE** : est le spectre de sensibilité d'une souche à une collection de bactériophages. 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 (MAINIL J, 2003).

### I.6. Commensalisme et pathogénicité de *E.coli*

La majorité des souches de *E. coli* sont commensales, et vivent sans importuner leur hôte. L'autre partie des souches sont pathogènes et entraînent des problèmes de santé chez leur hôte humain ou animal. Si certaines infections sont bénignes, *E. coli* provoque la mort de plus de 2.5 millions de personnes par an, ce qui fait de cette espèce l'un des agents les plus mortels qui existent (Thomas et Johnson 2003). Il n'existe pas un mode unique de virulence chez les *E. coli*, et une souche peut très bien rester dans l'hôte sans provoquer de symptôme. L'agressivité de la bactérie va dépendre de l'état de l'hôte et de ses défenses immunitaires : c'est pourquoi on dit que les *E. coli* sont des pathogènes opportunistes. La séparation entre *E. coli* commensales et pathogènes n'est pas stricte, et la nature de l'hôte est importante : la souche APEC O1 est un pathogène des oiseaux (*Avian Pathogenic E. coli*), tandis que la souche du sérotype O157:H7 est spécifique des hommes.

#### I.6.1. La notion de pathotype

La réponse vint d'une intuition géniale d'un vétérinaire danois, Carl Oluf Jensen (1864-1934), qui émit l'hypothèse que l'espèce *E. coli* était en fait hétérogène et composée de souches provoquant des pathologies et de souches tout à fait inoffensives. Mais, à cette époque, aucun moyen n'existait pour reconnaître et différencier ces souches, sauf la reproduction expérimentale des pathologies chez les espèces animales hôtes naturels. La détermination des sérotypes (Gerardin et al., 2003) est le premier système qui a permis, dans une certaine mesure, de différencier des souches pathogènes de souches commensales, chez l'homme dans un premier temps, chez les animaux par la suite (Hacker J., Kaper J.B. 2000). En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des pathologies, tandis que d'autres le sont très fréquemment. Par la suite, divers chercheurs ont fait œuvre pionnière en reconnaissant 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 (**Khan et al., 2000**). La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche constitue un nouveau moyen de typage d'*E. coli*, que l'on désigne sous le néologisme de PATHOTYPIE.

### **I.6.2. Classification des pathotypes d'*E. coli***

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 (**Savoie, 2011**). Il existe deux classes de pathogènes : les pathogènes intestinaux ou InPEc (*Intestinal Pathogenic E. coli*) et les pathogènes hors de l'intestin ou ExPEc (*Extra-intestinal Pathogenic E. coli*). Chacune de ces classes est divisée en pathovars, aux nombres de deux pour les ExPEc et de 6 pour les souches InPEc (**Nataro et Kaper 1998**). Les souches ExPEc sont séparées en fonction de leur lieu d'infection (**Croxen et Finlay 2010**) : ainsi on trouve les *E. coli* uropathogènes ou UPEC (*UroPathogenic E. coli*) qui vont provoquer des infections dans le système urinaire (rein et vessie), et les *E. coli* méningitiques du nouveau-né ou NMEC (*Neonatal Meningitidis E. coli*) qui agissent dans le cerveau. Les deux pathovars peuvent être trouvés dans le sang puisque c'est ainsi que les bactéries atteignent leur cible. Les ExPEc peuvent aussi provoquer des septicémies et des infections respiratoires. Trois des pathovars de InPEc agissent dans le gros intestin : Les *E. coli* entéro-agrégatives ou EAEC (*EnteroAggregative E. coli*), les *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC (*EnteroHaemorrhagic E. coli*), les *E. coli* entéroinvasifs ou EIEC (*EnteroInvasive E. coli*) et les *Shigella*. Dans l'intestin grêle, on retrouve les EAEC et les trois autres pathovars : Les *E. coli* entérotoxigènes ou ETEC (*EnteroToxigenic E. coli*), les *E. coli* entéro-pathogènes ou EPEC (*EnteroPathogenic E. coli*) et les *E. coli* à adhérence diffuse ou DAEC (*Diffusely Adherent E. coli*) (**Nataro et Kaper 1998**) (Figure 4).

La classification des *E.coli* pathogènes intestinaux est :

❖ **Les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC)**

Ils sont majoritairement associés à deux syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et la diarrhée du voyageur. Ils sont présents essentiellement dans la partie proximale de l'intestin grêle et leur pouvoir pathogène s'explique par la sécrétion de toxines thermostables et/ou thermolabiles (Levine, 1987).

❖ **Les *E. coli* Enteropathogènes (EPEC)**

Ils sont responsables de diarrhées infantiles et touchent en particulier les enfants en bas âge (<3 ans). Des lésions histopathologiques apparaissent lors d'infections. Ces lésions sont appelées lésions d'attachement et d'effacement (Andrade *et al.*, 1989). Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhérence de l'intimine entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* sont à l'origine de ces lésions. (Jerse *et al.*, 1990).

❖ **Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)**

Ils sont de plus en plus reconnus comme étant responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes dans les pays en voie de développement ainsi que les pays industrialisés. Ils présentent un phénotype d'adhésion aux cellules Hep-2 proche de celui des EPEC mais toutefois différent puisqu'il s'agit d'une adhérence diffuse (Vial *et al.*, 1988).

❖ **Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)**

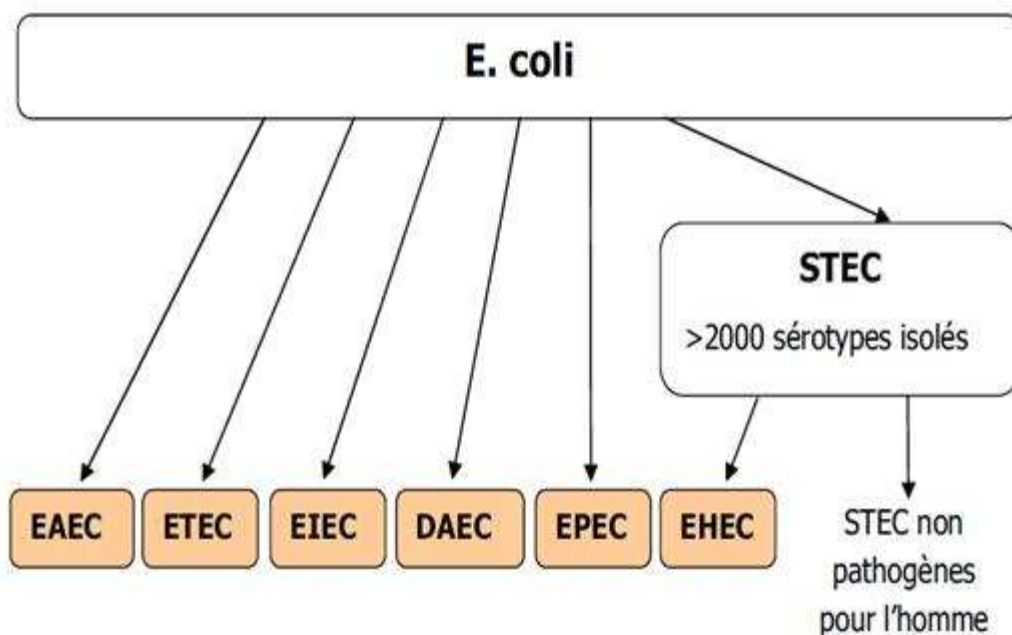
Ils sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnées d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en dysenterie. Ils sont biochimiquement et génétiquement assez proches de *Shigella spp* (Brenner *et al.*, 2003), tout comme leur pathogénie (invasion de l'épithélium intestinal).

❖ **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)**

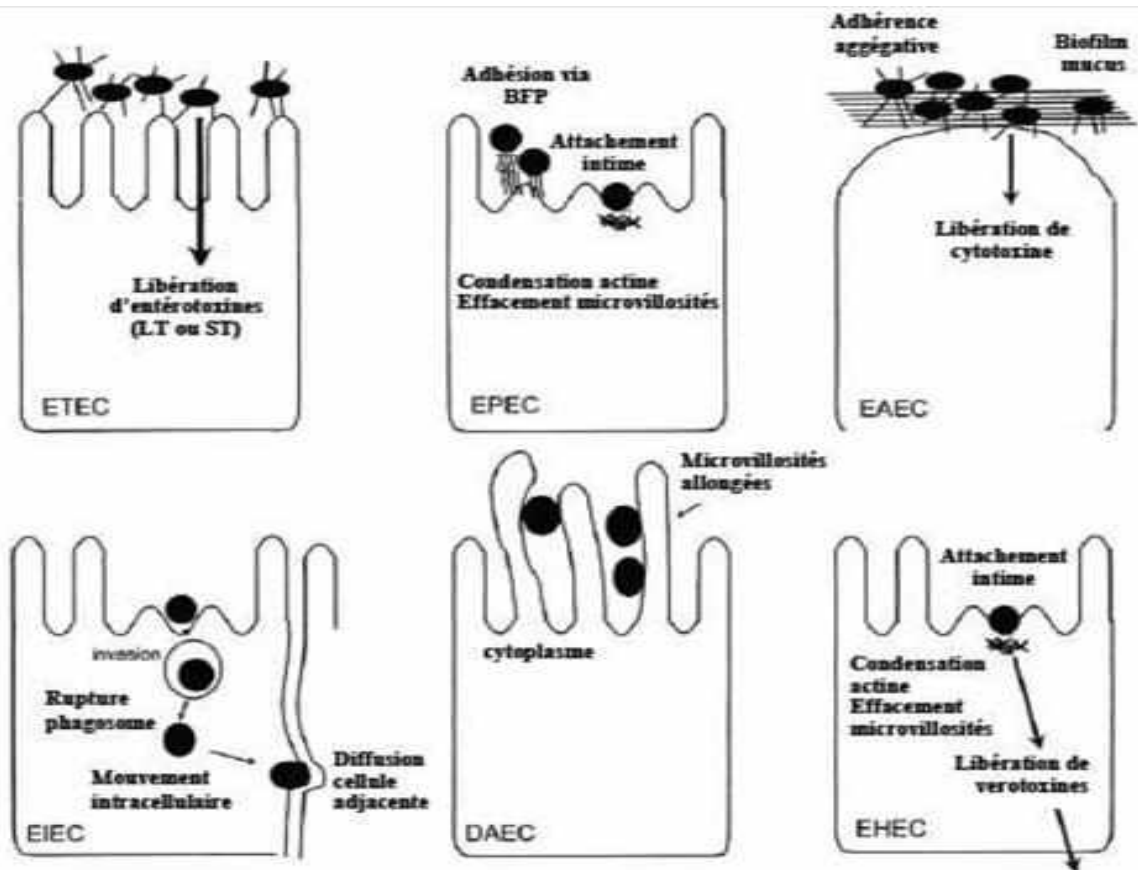
Ils sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. L'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse » sur les lignées cellulaires en culture (Cookson et Nataro, 1996).

#### ❖ Les *E. coli* Enterohémorragiques (EHEC)

Ils 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 (Nataro et Kaper 1998). Les EHEC qui sont des souches isolées chez les malades, possèdent typiquement au moins un gène *stx* (*stx1* codant pour la Shiga-toxine 1 ou *stx2* codant pour la Shiga-toxine 2) 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*]). Il est important de souligner néanmoins que tous les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme (Nataro et Kaper 1998).



**Figure 4:** Classifications des pathotypes d'*E. coli* (Nataro et Kaper 1998).



**Figure 5:** Mécanismes d'interaction des différents pathotypes d'*E. coli* responsables de diarrhées (Nataro et Kaper, 1998)

### I.7. Habitat et écologie

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, *Escherichia. coli*, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux.

La presque totalité des souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes puisque cette bactérie est un hôte normal de l'intestin des mammifères. Par ailleurs, parmi les coliformes fécaux,

*E. coli* est le seul qui soit sans équivoque toujours d'origine fécale et, à ce titre, il est de plus en plus considéré comme l'organisme indicateur spécifique d'une pollution fécale (Edberg *et al.*, 2000). Sa détection dans une eau doit donc être considérée comme reflétant la présence possible de microorganismes pathogènes d'origine entérique. *E. coli* peut survivre jusqu'à trois mois dans une eau naturelle non traitée (Edberg *et al.*, 2000), mais il est très sensible à la chloration, étant rapidement inactivé par une concentration de chlore résiduel libre variant de 0,2 à 1 mg/l (Chalmers *et al.*, 2000). Les bactéries n'ayant pas été inactivées ou détruites par la chloration sont par ailleurs capables de survivre pendant

quelques jours dans le réseau de distribution, sans toutefois proliférer (**McMath et Holt, 2000**). Ils peuvent être répandus dans la terre et l'eau de surface via le fumier et le lisier utilisés pour fertiliser les champs et les cultures. Les *E. coli* sont transmis aux autres animaux par la nourriture contaminée, par la manipulation et par l'eau potable. Ils peuvent aussi être transmis entre les fermes via les véhicules de transport. L'infection se fait par voie orale ou, dans le cas des oiseaux, par l'inhalation de poussière contaminée. Les *E. coli* d'origine animale peuvent aussi être transmis aux humains par contact direct ou par ingestion de nourriture ou d'eau contaminées par l'épandage de lisier, ou encore par ingestion de viande contaminée à l'abattoir (**Nougayrède et Oswald, 2011**). Chez le porc, les infections intestinales associées aux ETEC et aux STEC (maladie de l'œdème) sont souvent contagieuses, la même souche pouvant être retrouvée chez les porcs malades d'un même lot ou d'un lot à l'autre. Ces souches sont généralement excrétées pour seulement quelques jours après l'infection, probablement en raison du développement de l'immunité chez l'animal excréteur. Quant à elles, les infections associées aux ExPEC n'ont pas le même mécanisme que les maladies transmissibles. Dans un même lot d'animaux par exemple, différentes souches peuvent être retrouvées chez différents animaux et des infections mixtes associées à plus d'une souche peuvent affecter certains autres animaux, sans relation apparente entre la souche ou la combinaison de souches et la maladie. La microflore fécale est un réservoir pour les infections extraintestinales telles que les mastites ou l'infection du tractus urinaire. De la même façon, les EPEC sont généralement retrouvés dans les intestins et les fèces des animaux sains, pouvant toutefois causer la maladie chez les animaux immuno-déficients (**Sylvie, 2010**).

### **I.8. La phylogénie de *E. coli***

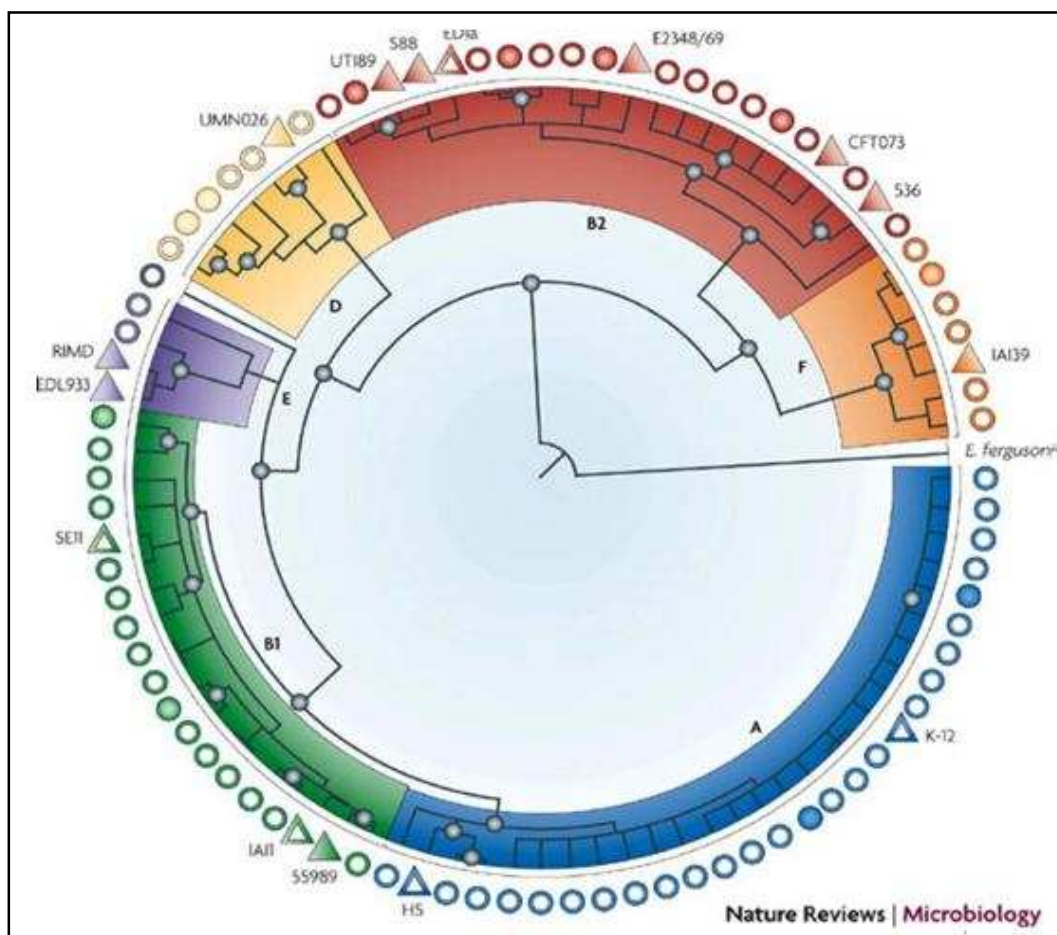
Les capacités d'adaptation sont le résultat de la plasticité génomique des *E. coli*. En effet les événements de mutations, recombinaisons et transfert horizontaux ne sont pas des événements rares (**Touchon et al. 2009; Tenaillon et al. 2010**). Ceux-ci interviennent de façon ponctuelle. Par conséquent il est possible de retrouver l'histoire évolutive des différentes souches. Les *E. coli* se répartissent dans quatre groupes phylogénétiques : A, B1, B2 et D (**Tenaillon et al. 2010**) (Figure 6).

Ces groupes ne sont pas figés et évoluent en même temps que les connaissances : depuis peu le groupe D est scindé en un groupe D et un groupe E (**Jaureguy et al. 2008**).

La proximité des espèces du genre *Escherichia* rend souvent difficile le classement des souches, et ce sont des marqueurs métaboliques qui permettent de différencier les espèces *E. coli*, *E. albertii* et *E. fergusonii*. Parfois ce sont les divergences de séquences qui permettent d'affilier les souches à des espèces. Ainsi en 2009 des souches, considérées comme des *E. coli* et partageant les différents critères caractéristiques des *E. coli*, ont finalement été réassignées dans cinq nouveaux clades (**Walk et al. 2009**).

Le nombre de souches de *E. coli* varie d'un individu à un autre est d'une région à une autre. Il en est de même pour la proportion des différents groupes phylogénétiques.

Elle peut varier du simple au triple entre les différents pays ; de plus on constate qu'elle n'est pas fixe avec le temps ; ainsi on est passé d'une majorité de souches du groupe phylogénétique A en 1980 à une répartition pratiquement uniforme entre les groupes A, B1, B2 et D en 2000.

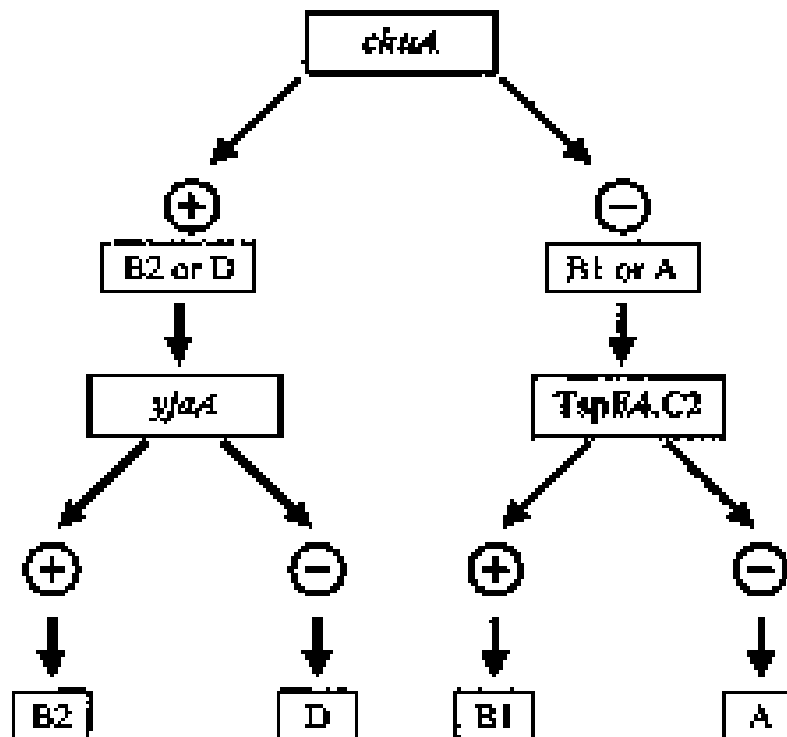


**Figure 6:** Arbre phylogénétique des *E. coli* (Tenailon et al. 2010).

### I.8.1. Les groupes phylogéniques

Les souches d'*E. coli* peuvent être séparées dans quatre principal groupes phylogénétiques: **A**, **B1**, **B2** et **D**. les groupes **A** et **B1** incluent souvent les germes commensales et groupe **B2**, et de moindre ampleur le groupe **D**, habituellement incluent les souches pathogènes extra-intestinal (Johnson et al. 2001).

(Clermont et al. 2000) a décrit une simple méthode Basée sur la PCR qui utilise une combinaison des gènes *chuA* et *yjaA* et la fragment d'ADN TSPE4.C2 pour assigner des souches de *E. coli* aux groupes phylogénétiques **A**, **B1**, **B2** et **D**. Les souches étaient assignées au groupe phylogénétique **B2** (*chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>+</sup>), **D** (*chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>), **B1** (*chuA*<sup>-</sup>, TSPE4.C2<sup>+</sup>) ou **A** (*chuA*<sup>-</sup>, TSPE4.C2<sup>-</sup>) (Figure 7).



**Figure 7:** Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches de *E. coli* par amplification génique (PCR) ( Clermont et al., 2000).

- **le groupe A** : est le groupe phylogénétique où se concentre majoritairement les souches commensales non pathogènes de l'espèce d'*E. coli* et où le plus faible taux de gènes codant des facteurs de virulence est recensé (Picard et al, 1999). Par conséquent, la présence des souches pathogènes au sein de ce groupe n'est pas expliquée par l'existence d'un ancêtre

pathogène dont les descendantes aurait, pour la plupart, perdu le caractère virulent, mais par l'existence d'un ancêtre non pathogène dont quelques descendantes seulement aurait acquis un caractère virulent, ceci à la suite d'événement de transferts génétiques horizontaux (**Picard et al, 1999**).

**-le groupe B1** : tout comme le groupe **A**, est d'ailleurs caractérisé par le génome core capable d'accueillir la plus large gamme de gènes codant des facteurs de virulences intestinaux et extra-intestinaux sont identifiés dans le génome des souches de ce groupe (**Picard et al, 1999**).

**-les groupes B2 et D** renferment les souches qui possèdent généralement des facteurs de virulence, et qui provoquent la plupart des infections extra-intestinales et ont une capacité supérieure à persister dans le microbiote colique infantile. Les souches de type **D** et **B2**, caractérisées par une organisation fortement clonale, regroupent la majorité des souches responsables de pathologies extra-intestinales de l'adulte. Le groupe **B2** était relié aux souches responsables d'infections du tractus urinaire, bactériémies et méningites néonatales mais pas aux souches diarrhéiques (**Johnson J.R. 2000**).

*Matériels*

*Et*

*Méthodes*

## Matériel et méthodes

### 1. Présentation du site

La station d'épuration de Boumerdès est un exemple édifiant dans l'utilisation de système classique par boue activée a faible charge, d'une capacité équivalente à 75000 habitants et d'un volume de 15000 m<sup>3</sup> / jour. L'infrastructure est dotée de tous les équipements et les moyens humains susceptibles d'assurer le suivi dans le processus d'épuration des eaux usées.

#### **Localisation géographique :**

Notre étude a été réalisée au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines située dans la wilaya de Boumerdes, délimitée par oued tatareg au nord, des terrains agricoles au sud, une zone d'activité à l'est et la route nationale à l'ouest (coordonnées : 36°44'51"N 3°28'4"E). Cette station a été réalisée en 1996, et mise en service en janvier 2001. Elle permet de traiter les eaux de la commune de Boumerdes, de Corso, et de Tidjelabine (Figure 9).

#### **Capacité de traitement :**

La station a une capacité d'épuration de 75000 équivalents habitant (EQH), avec un volume journalier de 15000 m<sup>3</sup>/j. Le débit de pointe en temps sec et en temps de pluie est respectivement de 1063m<sup>3</sup>/j, 1944m<sup>3</sup>/j. La DBO5 et les MES journalier sont de 4050Kg/j et 5250Kg/j respectivement.

#### **Caractéristiques de la station :**

La station d'épuration fonctionne selon un procédé à boues activées qui consiste en une série de trois bassins d'aération qui fonctionnent par alternance. La séparation entre l'eau traitée et les boues est effectuée dans un clarificateur avec un recyclage d'une partie des boues dans le bassin d'aération. L'excès en boues activées est séché et stocké avant d'être envoyé à la décharge. L'eau traitée est évacuée directement sans aucun traitement supplémentaire dans

le milieu naturel (Oued Tatarag). Exceptionnellement, l'eau traitée peut être réutilisée après traitement dans l'irrigation.

Les normes de rejets à la sortie de la station sont les suivantes :

MES.....	30mg/l
DCO.....	90mg/l
DBO5.....	30mg/l
NKT.....	40mg/l



**Figure 9:** Photo satellitaire de la station d'épuration de BOUMERDES (Google Earth 2013).

## **2. prélèvement et sélection des souches résistantes aux quinolones**

Les prélèvements d'eau ont été effectués à 10 cm de la surface dans des flacons de 500ml stériles. Des mesures physicochimiques (pH, température) ont été réalisées *in situ* à l'aide d'un pH-mètre de marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW » comportant une sonde de température.

Les prélèvements ont été transportés au laboratoire dans une glacière (10°) et les analyses ont été effectuées dans les 24h.

## **3. méthodes**

### **3.1-Identification**

Après une confirmation de la résistance des souches aux quinolones, une identification par galerie API 20 E a été entreprise.

#### **Principe**

La galerie API 20E est un système d'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif. Elle comporte 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés. Les milieux déshydratés sont reconstitués avec une suspension bactérienne. Les réactions

produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Biomerieux).

### Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide ;
- retirer la galerie stérile de son emballage et la déposer dans la boîte d'incubation ;
- préparer l'inoculum bactérien : mettre 1 à 3 colonies jeunes dans de l'eau distillée stérile
- inoculer la galerie comme suit :
- Remplir les tubes et cupules des tests (CIT, VP et GEL).
  
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, en remplissant leur cupule d'huile de vaseline;
- incuber à 37°C pendant 24-48heures;
- le test d'oxydase est réalisé par le dépôt d'un inoculum bactérien sur le disque d'oxydase contenant l'oxalate de diméthyle-paraphénylène-diamine. La présence du cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette.

### Lecture

Ces galeries doivent être lues selon les recommandations du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, l'identification est obtenue on se référant à un catalogue analytique (Biomérieux).

### 3-2-Phylogenie

La phylogénie est l'étude de la parenté évolutive entre les différents groupes de l'organisme. Les souches de *E. coli* peuvent être attribuées à l'un des principaux groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) (Herzer et al., 1990). Selon Lecointre et al. (1998) Les groupes A et B1 sont des groupes sœurs alors que le groupe B2 est inclus dans une branche ancestrale. Les souches de ces groupes diffèrent dans leurs caractéristiques phénotypiques, y compris la possibilité d'utiliser certains sucres et les profils de résistance aux antibiotiques.

### 3.2.1. Extraction de l'ADN

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

### 3.2.2. Détermination des groupes phylogénétiques par PCR :

#### Principe de la PCR :

La PCR est une réaction qui permet l'amplification de fragments d'ADN de manière exponentielle. C'est une réaction cyclique qui repose sur le principe de la réplication de l'ADN par une ADN polymérase. Mais, dans ce cas, la réplication ne se fait pas entre deux origines de réplication, mais entre deux amorces se fixant chacune sur un brin de l'ADN matrice (**Branger et al, 2007**). Le processus nécessite la succession d'un certain nombre de cycles (20-40), chaque cycle comporte les étapes suivantes :

- La dénaturation de l'ADN entre 90 – 97 C°.
- L'hybridation : fixation des amorces de part et d'autre du fragment à amplifier (40-60°C).
- L'élongation : la synthèse du brin d'ADN est assurée par la Taq polymérase à 72°C, en respectant la complémentarité des bases.

- **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 (Tableau1) 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).

- **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), amorces sens et anti-sens 0,5 µM chacune et 2.5 µl d'ADN.

- **Conditions des PCR**

Les réactions de PCR 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 / 30sec et d'élongation à 72°C / 30sec. Enfin, une étape d'élongation finale à 72°C / 7min

**Tableau 1** : liste des amorces utilisées pour la détermination de la phylogénie d'*E.coli*

Gène	Séquence d'amorces 5'-3'	Taille de l'amplifié (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	
TSPE4.C2	TspE4C2-1 : GAGTAATGTCGGGGCATTCA TspE4C2-2 : CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	

- **Technique d'électrophorèse**

L'électrophorèse sur gel d'agarose a pour principe la séparation, l'identification et la purification de l'ADN chargé négativement. La migration de l'ADN dans le gel d'agarose, soumis à un champ électrique dépend des paramètres suivants: le poids moléculaire, la concentration d'agarose dans le gel, la conformation de l'ADN, le voltage appliqué et la composition du tampon d'électrophorèse (**Sambrook et al., 1989**).

### Technique

- préparation d'un gel d'agarose (1,2%) dans du tampon TBE 1X, additionné de Bromure d'ethidium (0.5µg/ml);

- déposer l'échantillon à analyser dans le gel ;
- appliquer un champ électrique à un voltage de 5V/cm;
- visualiser l'ADN sous UV à 254nm.

### **Solution employée :**

**Tampon TBE 10X** (pH 8,3, autoclave et conservé à température ambiante) :

- 890mM de tris base.
- 890mM d'acide borique.
- 19mM d'EDTA.

### **Bleu de dépôt :**

- Glycérol 50%
- EDTA-NA<sub>2</sub> 100mM pH : 8
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) 3%

### **3.3. Antibiogramme**

L'étude de la résistance de nos souches vis-à-vis de **21** antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide (**Courvalin, 1985 ; CA-SFM, 2010**).

#### **Principe**

Cette technique est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotiques, obtenu par diffusion à partir des disques d'antibiotiques dans un milieu gélose (Muller-Hinton). Ce gradient est inversement proportionnel à la distance par rapport aux disques. La croissance s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec leur concentration minimale d'inhibition dessinant des halos d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

#### **Technique**

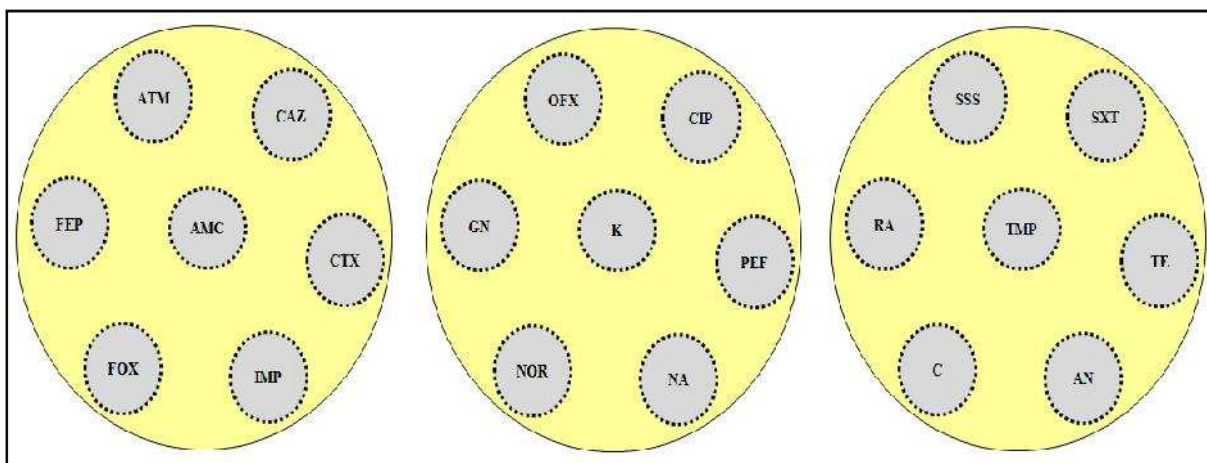
- A partir d'une culture jeune (18-24h), préparer dans 5ml d'eau physiologique une suspension bactérienne de 0,5McFarland.
- ajuster l'inoculum à 10<sup>7</sup> cellules/ml.
- plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de 10<sup>7</sup> cellules/ml;

## MATERIEL ET METHODES

- ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée et en tournant la boîte trois fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum;
- appliquer les disques d'antibiotiques (tableau 2) à l'aide d'un distributeur stérile selon le schéma de la (figure 10);
- laisser diffusé pendant 15 minutes, à température ambiante;
- Incuber à 37°C pendant 18-24h.

### Lecture

Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'une règle graduée ou pied à coulisse et classer les bactéries dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) selon les valeurs critiques (CA-SFM., 2011).



**Figure 10:** Schéma de la disposition des antibiotiques

## MATERIEL ET METHODES

**Tableau 2:** Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.

Famille d'antibiotique utilisée		Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)
Quinolones		Ofloxacine	OFX	5
		Acide nalidixique	NA	30
		Ciprofloxacine	CIP	05
		Norfloxacine	NOR	5
		Péfloxacine	PEF	5
β-lactamines	Monobactame	Aztréonam	ATM	30
	Carbapénèmes	Imipénème	IMP	10
	Céphalosporines de 2 <sup>ème</sup> génération	Céfoxitine	FOX	30
	Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération	Céfotaxime	CTX	30
		Ceftazidime	CAZ	30
	Céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération	Céfépime	FEP	30
Pénicilline-association	amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10	
Aminosides		Kanamicine	K	30
		Amikacine	AN	30
		Gentamicine	GN	15 (10 UI)
Sulfamides-Triméthoprime		triméthoprime	TMP	5
		Sulfaméthoxazole + Triméthoprime	SXT	1,25/23,75
Tétracyclines		Tétracycline	TE	30
Phénols		Chloramphénicol	C	30
Sulfamide		Sulfamide	SSS	200
Divers		Rifampicine	RA	30

*Résultats*

*Et*

*Discussion*

## III. RESULTATS

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux bactéries résistantes au Ciprofloxacine (CIP), un antibiotique puissant et un indicateur de la production de mécanisme de résistance acquis. Vingt huit souches lactose positif et résistantes au Ciprofloxacine récupérées lors d'une étude réalisée en 2010 (Berkane et Zian, 2010) ont fait l'objet de la détermination de leurs groupes phylogénétiques ainsi que l'association de ce fond génétique avec la résistance aux antibiotiques.

### III.1. Identification Bactérienne

Les résultats de l'identification biochimique par galeries API20E des 28 souches isolées, ont révélé que toutes les souches sont des *E.coli* dont 16 collectées à partir des eaux usées et 12 à partir des eaux usées traitées.

### III.2. Phylogénie des souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones.

A fin de déterminer la phylogénie des 28 souches d'*E.coli* résistantes aux quinolones nous nous sommes intéressés à la recherche des gènes (*chu A*, *Yja*) et le fragment d'ADN *TSPE4.C2* qui nous permet de grouper ces souches en 4 groupes : A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et D. Ce travail a pour objectif la détermination des groupes phylogénétiques avant et après traitement ainsi que leur association avec la multirésistance des souches.

#### III.2.1. Recherche du gène *chuA*

Les résultats de la PCR révèle que le marqueur *chuA* été présent dans une seule souche isolée à partir des eaux usées et trois souches isolées à partir des eaux traitées (Figure 11, tableau 3). La présence de ce gène indique que les ces souches font partie du groupe (D+B<sub>2</sub>), alors que toutes les autres souches restantes seraient de type commensal (A+B<sub>1</sub>).

#### III.2.2. Recherche du gène *YjaA*

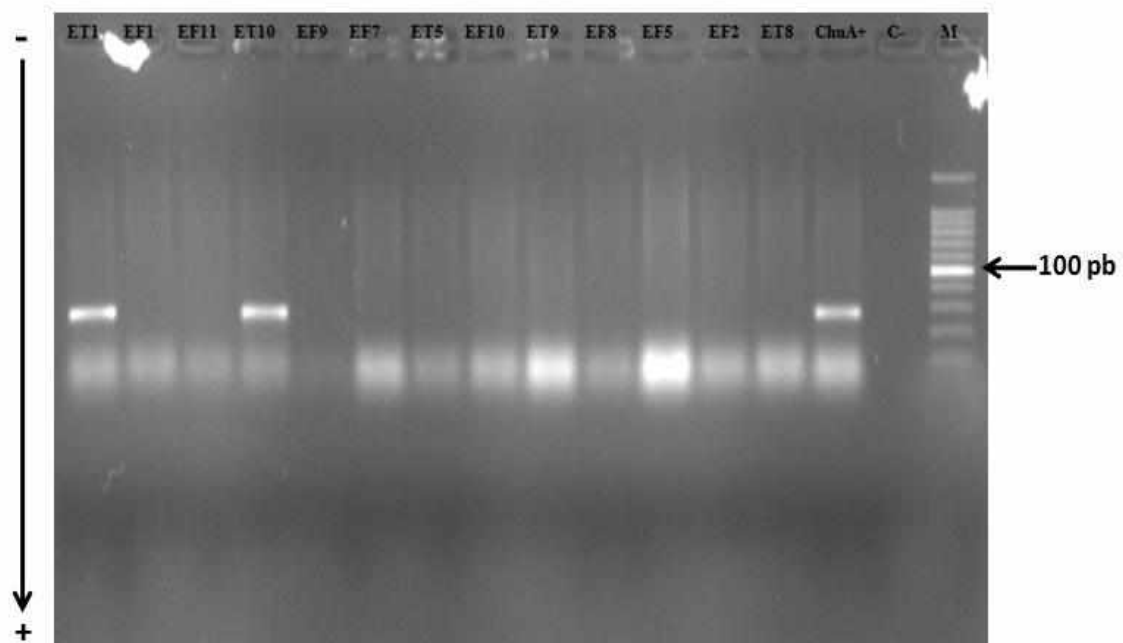
De la même manière, le marqueur *yjaA* a été trouvé chez 15 souches d'*E. coli* dont 2 possédant déjà le gène *ChuA* ce qui nous permet de les classer dans le groupe B<sub>2</sub>. Les deux autres souches *ChuA*<sup>+</sup> et *YjaA*<sup>-</sup> sont assignées au groupe D (Figure 12, Tableau 3).

Il est à signaler que la présence de ce gène chez les souches *ChuA*<sup>-</sup> n'est pas prise en considération dans la classification de Clermont et al., (2000).

## III.2.3. Recherche de TspE4.C2

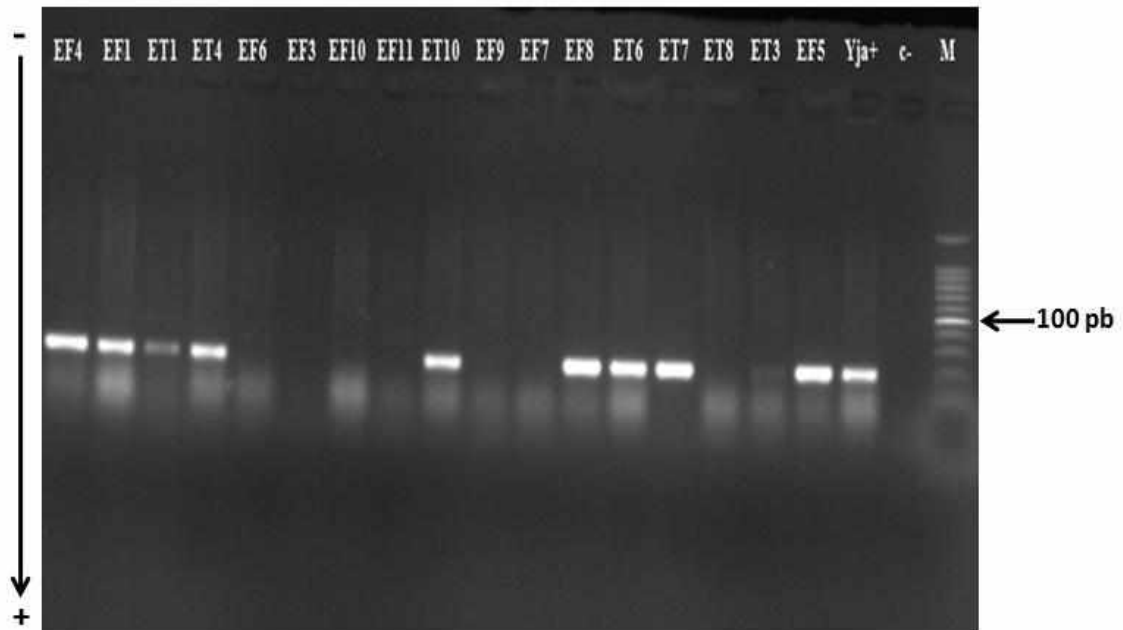
Le fragment d'ADN TspE4.C2 a également retrouvé chez 14 souches dont 10 souches ne possèdent pas le gène *ChuA* ce qui nous permettra de les assigner aux groupes B1. Les 14 autres souches négatives pour le fragment d'ADN TspE4.C2 sont assignées au groupe commensal A. (Figure 13, Tableau 3).

La présence de ce fragment chez les quatre souches *ChuA*<sup>+</sup> n'est pas prise en considération selon la classification de Clermont et al., (2000).

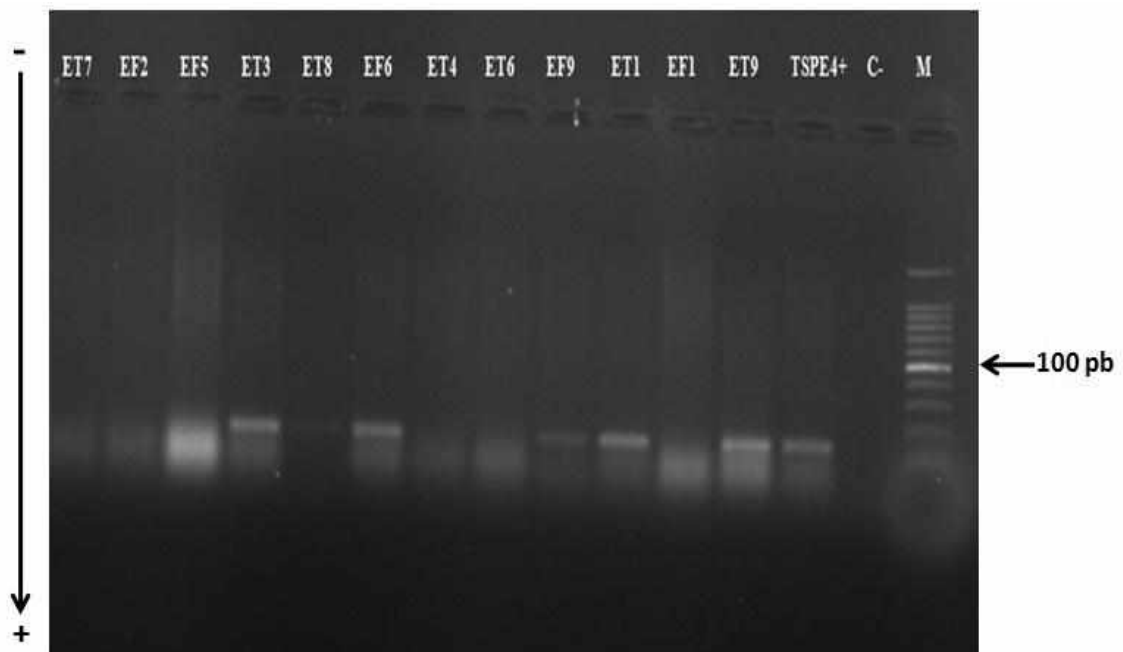


**Figure 11:** illustration de la présence du gène *ChuA* chez les souches d'*E.coli*.

M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, *ChuA*<sup>+</sup> : contrôle positif.



**Figure 12:** illustration de la présence du gène YjA chez les souches d'*E.coli*.  
M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif.



**Figure 13:** illustration de la présence du fragment d'ADN TspE4.C2 chez les souches d'*E.coli*.  
M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif.

**Tableau 3:** Distribution des souches *E.coli* isolées selon les groupes phylogénétiques

Souches		Origine	Identification	biotype	ChuA	Yja	TSEp4C2	Phylogroupe
<b>Groupe A</b>	EF1	EF	<i>E.coli</i>	5044552	-	+	-	A
	EF2	EF	<i>E.coli</i>	5044552	-	+	-	A
	EF4	EF	<i>E.coli</i>	5044553	-	+	-	A
	EF5	EF	<i>E.coli</i>	5044553	-	+	-	A
	EF7	EF	<i>E.coli</i>	5104552	-	-	-	A
	EF8	EF	<i>E.coli</i>	5044552	-	+	-	A
	EF11	EF	<i>E.coli</i>	1044572	-	-	-	A
	EF13	EF	<i>E.coli</i>	5144512	-	-	-	A
	EF15	EF	<i>E.coli</i>	5144512	-	-	-	A
	ET4	ET	<i>E.coli</i>	5044152	-	+	-	A
	ET5	ET	<i>E.coli</i>	5144572	-	+	-	A
	ET6	ET	<i>E.coli</i>	1044572	-	+	-	A
	ET7	ET	<i>E.coli</i>	1044572	-	+	-	A
	ET8	ET	<i>E.coli</i>	5144572	-	-	-	A
<b>Groupe B1</b>	EF3	EF	<i>E.coli</i>	5144572	-	-	+	B1
	EF9	EF	<i>E.coli</i>	5144572	-	-	+	B1
	EF10	EF	<i>E.coli</i>	5144572	-	-	+	B1
	EF12	EF	<i>E.coli</i>	5044572	-	+	+	B1
	EF14	EF	<i>E.coli</i>	5144572	-	-	+	B1
	EF16	EF	<i>E.coli</i>	5044142	-	+	+	B1
	ET2	ET	<i>E.coli</i>	5044552	-	+	+	B1
	ET9	ET	<i>E.coli</i>	5144572	-	-	+	B1
	ET11	ET	<i>E.coli</i>	5044572	-	+	+	B1
	ET12	ET	<i>E.coli</i>	5044552	-	-	+	B1
<b>Groupe D</b>	EF6	EF	<i>E.coli</i>	5044752	+	-	+	D
	ET3	ET	<i>E.coli</i>	5044572	+	-	+	D
<b>Groupe B2</b>	ET1	ET	<i>E.coli</i>	5144572	+	+	+	B2
	ET10	ET	<i>E.coli</i>	5144572	+	+	+	B2

EF : Effluent

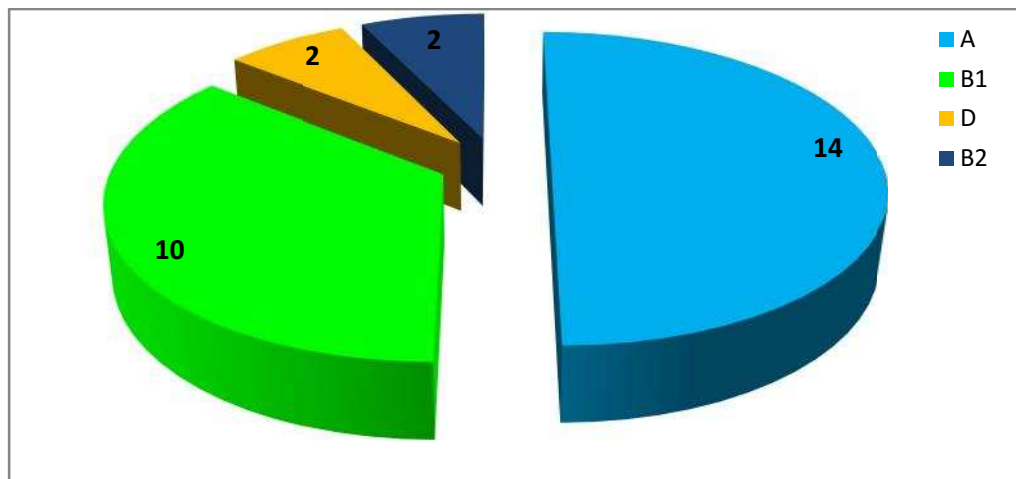
ET : Eau traitée

### III.3.4. Détermination des groupes phylogénétiques

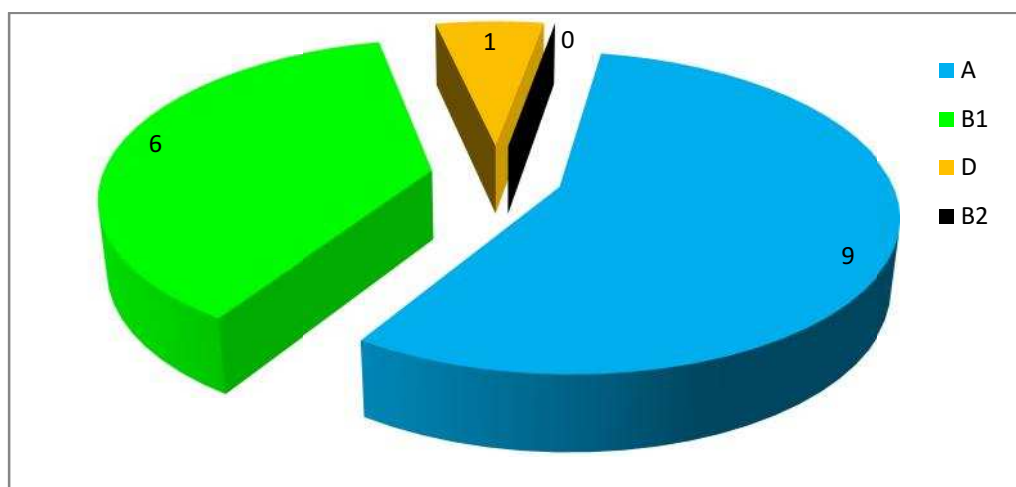
L'analyse phylogénique montre que 14 souches (50%) appartenant au groupe A, 10 souches appartenant au groupe B1, 2 souches appartenant au groupe D et 2 souches appartenant au groupe B2 (Tableau 3, Figure 14).

Pour les eaux usées les 16 souches sont répartis sur trois groupes phylogénétiques, 9 dans le groupe A, 6 dans le groupe B1, et une dans le groupe D (Figure 15).

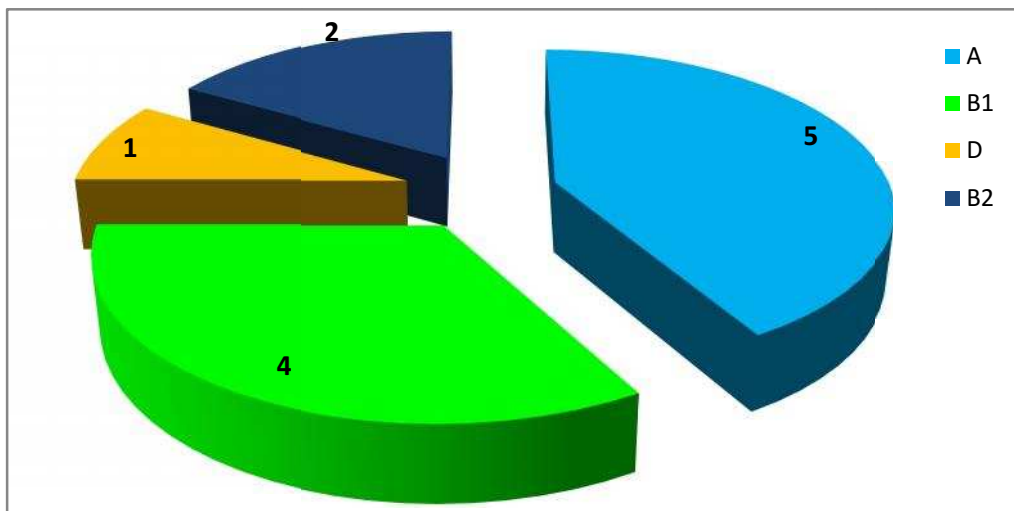
Concernant les eaux traitées, le groupe A est composé de 5 souches, le groupe B1 de 4 souches, le groupe B2 de deux souches et le groupe D d'une souche (Figure 16).



**Figure 14:** distribution des groupes phylogénétiques des 28 souches d'*E.coli*



**Figure 15:** distribution des groupes phylogénétiques dans les eaux usées



**Figure 16:** distribution des groupes phylogénétiques dans les eaux traitées

Les résultats obtenus montre que le groupe **A** est le plus dominant soit un pourcentage de 50%, suivi par le groupe **B1** avec un taux de 35,71% (groupes **A** et **B1** renferment les souches commensales). Les groupes **D** et **B2** (souches pathogènes) présentent un faible taux soit 7,14% pour chacun.

La comparaison des taux de résistance selon les groupes phylogéniques avant et après traitement montre qu'il ya une diminution des taux pour les **A** et **B1**, et une augmentation pour les groupes **D** et **B2**.

### III. 3. Profils d'antibiorésistance des souches résistantes au ciprofloxacine

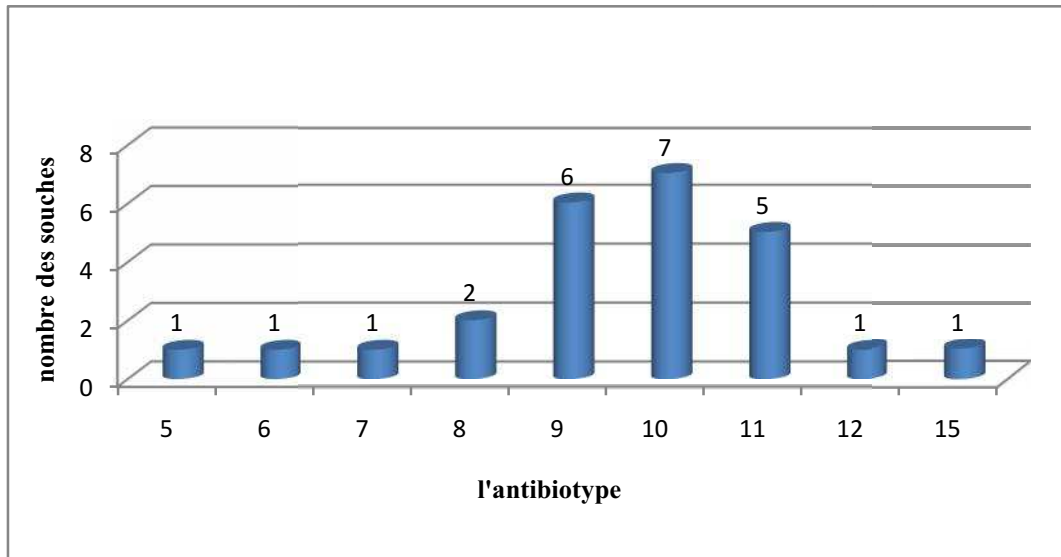
La résistance des souches identifiées vis-à-vis de 21 antibiotiques dont 5 quinolones a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (*CA-SFM, 2010*).

L'analyse des profils de résistance révèle que les souches sont multi-résistantes allant de 3 à 5 quinolones et de 5 à 15 molécules d'antibiotiques repartit dans 14 antibiotypes différents (Tableau 4).

7 souches (25% des souches) sont résistantes a 10 molécules, 6 souches résistantes à 9 molécules, 5 souches résistantes a 11 molécules, 2 souches résistantes à 8 molécules, une résistantes à 15 molécules, une résistantes à 12 molécules, une résistantes à 7, une résistantes à 6 molécules et une résistantes à 5 molécules (Figure 17).

**Tableau 4:** Profils d'antibiorésistance des 28 souches résistantes au ciprofloxacine.

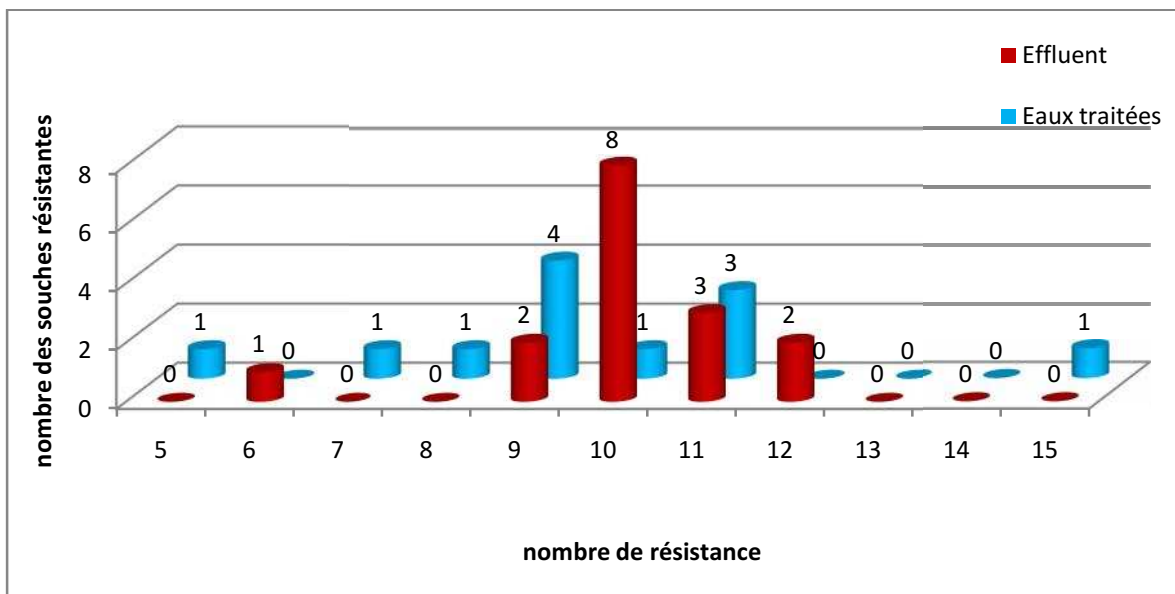
Souches		Antibiotype	N de R	EF	ET
ET <sub>11</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR.	5	0	1
EF <sub>12</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR RA.	6	1	0
ET <sub>12</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR TE RA.	7	0	1
EF <sub>16</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS TE RA	8	1	0
ET <sub>2</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS CTX TE.	8	0	1
EF <sub>13</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS TMP SXT TE.	9	2	2
EF <sub>14</sub>					
ET <sub>9</sub>					
ET <sub>10</sub>					
ET <sub>8</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K TMP SXT TE.	9	0	1
ET <sub>3</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TE RA.	9	0	1
EF <sub>4</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX GM K SSS TMP SXT TE.	10	1	0
EF <sub>8</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT TE.	10	4	0
EF <sub>1</sub>					
EF <sub>7</sub>					
EF <sub>11</sub>					
EF <sub>15</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS TMP SXT TE RA.	10	2	0
EF <sub>10</sub>					
EF <sub>2</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT C TE.	11	3	2
EF <sub>5</sub>					
EF <sub>3</sub>					
ET <sub>5</sub>					
ET <sub>4</sub>					
EF <sub>6</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT C TE RA.	12	1	0
ET <sub>1</sub>	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP C TE.	15	0	1



**Figure 17:** distribution des souches en fonction de leur antibiotype

Les résultats obtenus montre que les souches isolées à partir des effluents sont plus multirésistantes, avec 8 souches résistantes à 10 molécules, 3 souches résistantes à 11 molécules, 2 souches résistantes a 12 molécules, 2 souches résistantes a 9 molécules et une résistantes à 6 molécules (figure 18).

Concernant les souches isolées à partir des eaux traitées les résultats obtenus montrent qu'il ya 4 souches résistantes à 9 molécules, 3 souches résistantes à 11 molécules, une résistante à 15 molécules, une résistante à 10 molécules, une résistante à 8 molécules, une résistante à 7 molécules et une résistante à 5 molécules (figure 18)

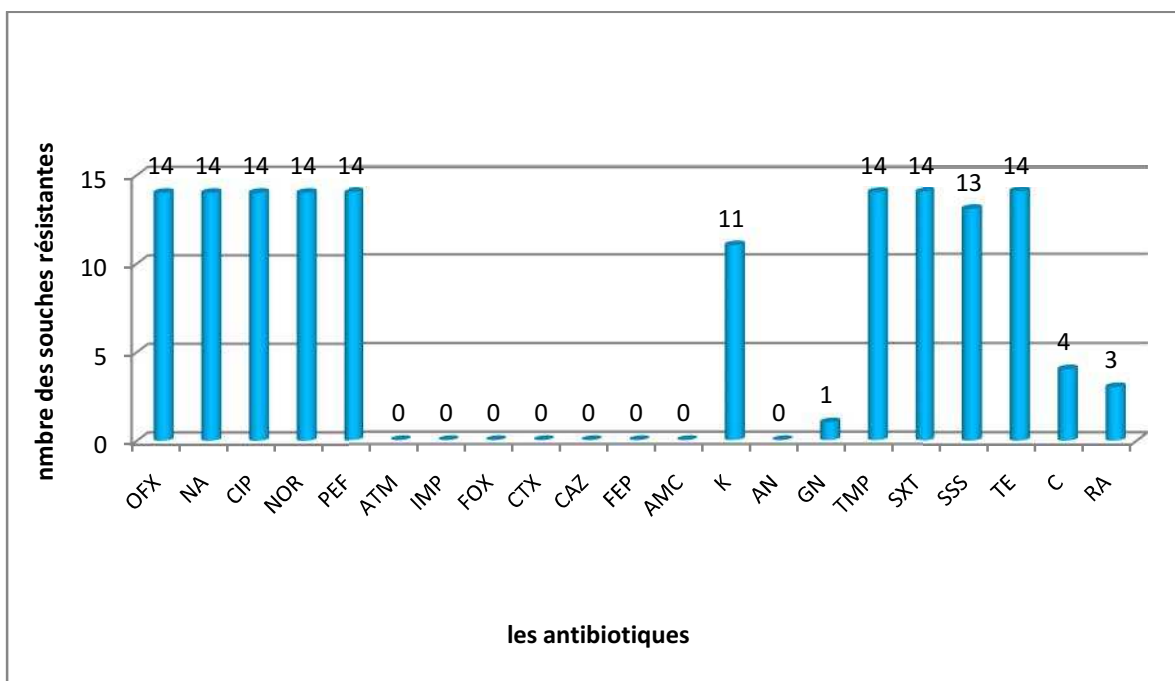


**Figure 18:** distribution des nombres de résistance avant et après traitement

### III.4. Association de la multirésistance et le fond génétique des souches.

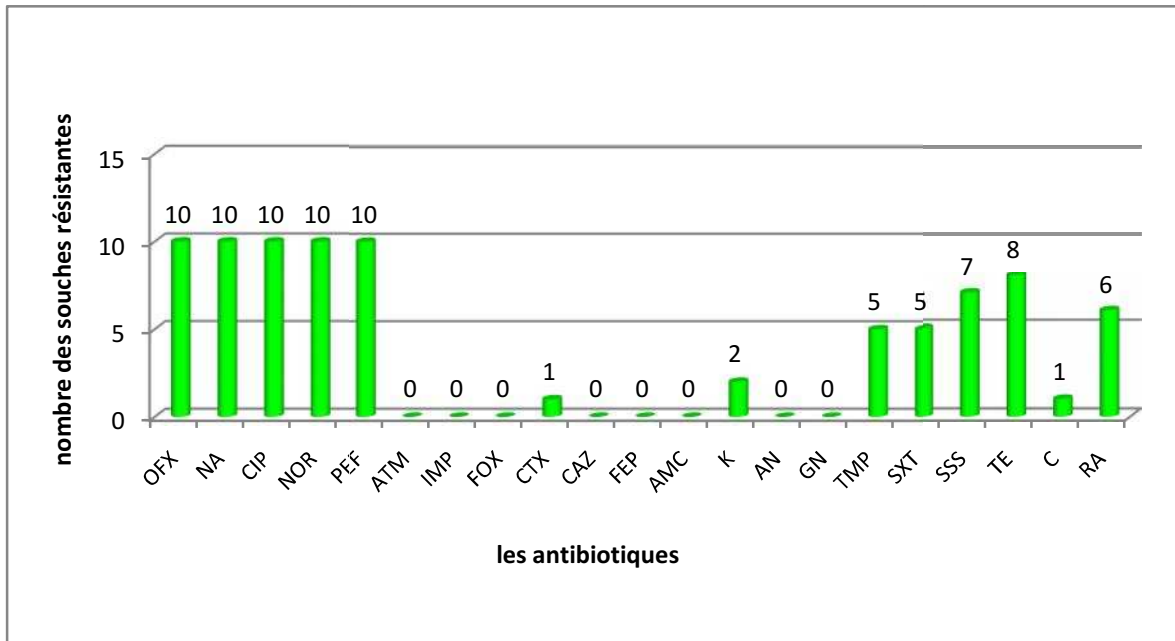
Les souches du groupe A présentent en plus de la résistance aux quinolones, des taux de résistance très élevées aux tétracyclines (n=14), triméthoprimes (n=14), l'association sulfaméthoxasoles-triméthoprime (n=14), sulfamides (n=14), suivi par la kanamycine (n=11). Des faibles taux de résistances ont été observés pour le chloromphénicol (n=4), la rifampicine (n=3) et la gentamicine (n=1).

Les souches du groupe A présentent une sensibilité totale pour les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines et pour l'amikacine (Figure 19)



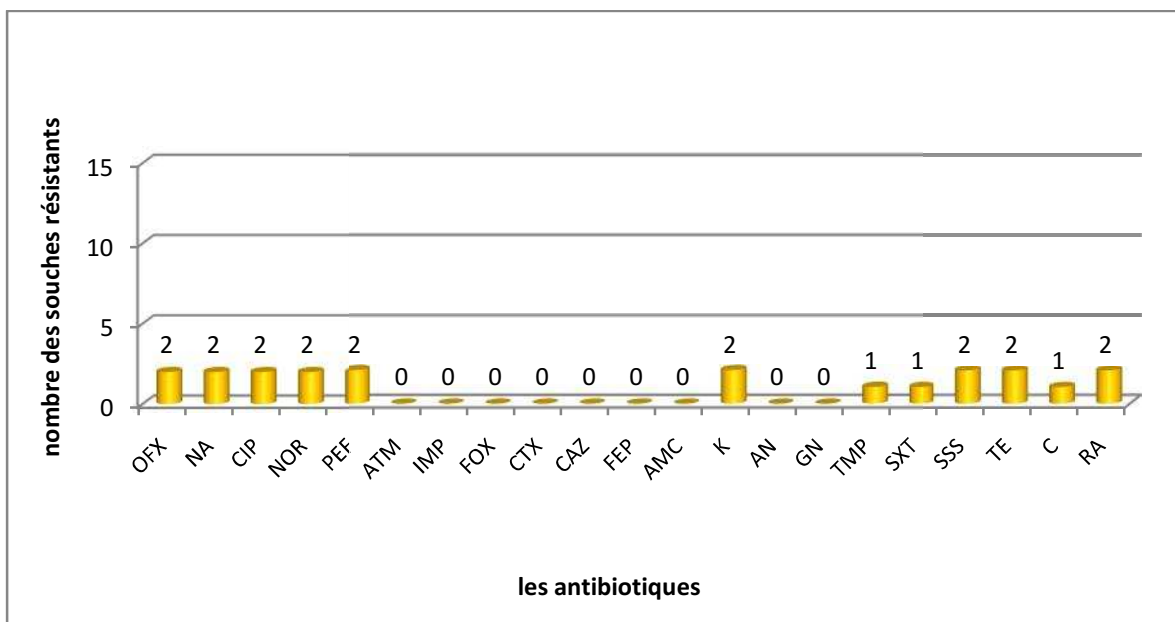
**Figure 19:** Résistance des 14 souches du groupe A vis-à-vis des antibiotiques.

De la même façon que dans le groupe A, les souches du groupe B1 présentent en plus de la résistance aux quinolones, des taux de résistance moyens à la tétracycline (n=8), aux sulfamides (n=7), au triméthoprime (n=5), l'association sulfaméthoxasoles- triméthoprime (n=5) et à la rifampicine (n=6). De faibles taux de résistance ont été observés vis-a-vis de la kanamycine (n=2), le céfotaxime (n=1) et le chloromphénicol (n=1). Ces souches présentent une sensibilité totale vis-à-vis des autres bêta-lactamines (amoxiciline, aztréoname, céftazidime, céfepime, et , imipénème (Figure 20).



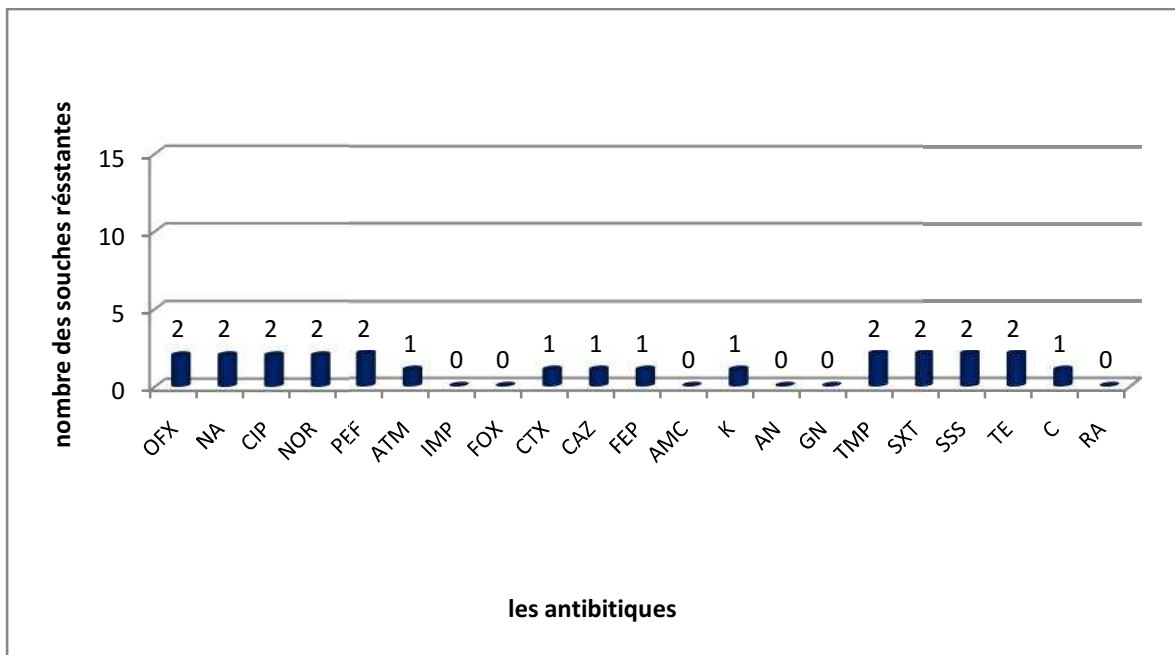
**Figure 20:** taux de résistance des 10 souches du groupe **B1** vis-à-vis des antibiotiques

En plus de la résistance aux quinolones, les deux souches du groupe **D** sont résistantes à la kanamycine, aux sulfamides, aux tétracyclines et à la rifampicine et sensibles aux bêta-lactamines et aux aminosides (amikacine, gentamicine) (Figure 21). Une seule souche a également été résistante au triméthoprim, à l'association sulfamétoxasoles-triméthoprim et au chloromphénicole.



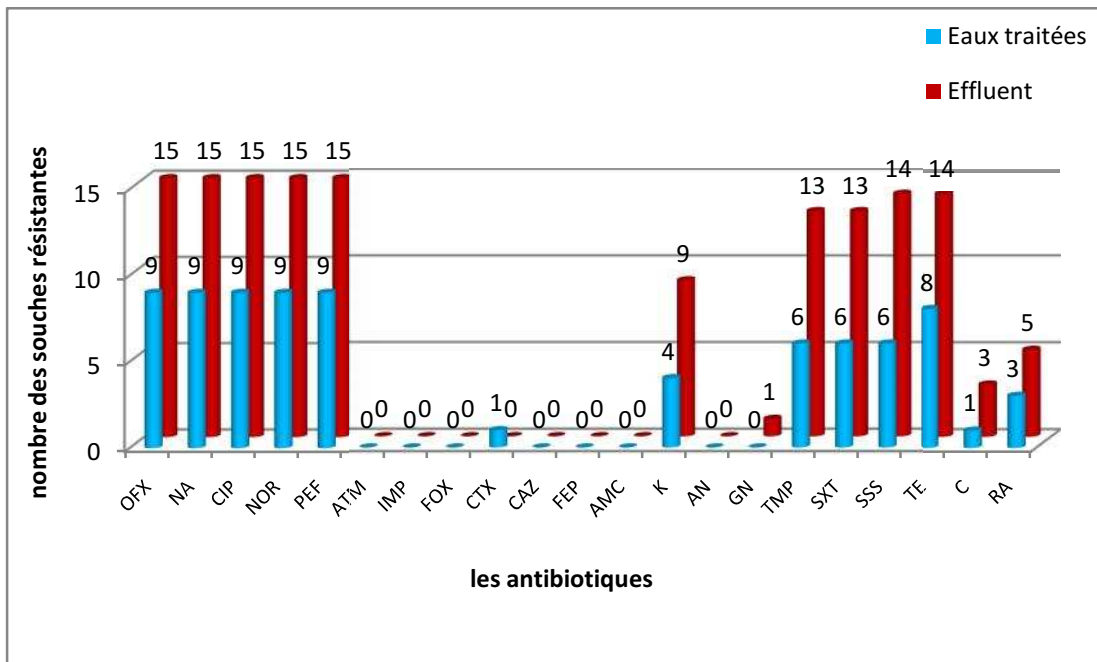
**Figure 21:** taux de résistance des 2 souches du groupe **D** aux antibiotiques

Les deux souches du groupe (B2) présentent en plus de la résistance aux quinolones, une résistance associée aux tétracyclines, aux sulfamides et association. Une seule souche a été trouvée résistante à l'aztréoname, le céfotaxime, la céftazidime, le céfépime, la kanamycine et le chloromphénicol et sensible aux bêta-lactamines (l'imipénème, l'amoxicilline) et aux aminosides (amikacine et gentamicine). (Figure 22)



**Figure 22:** taux de résistance des 2 souches de groupe B2 vis-à-vis les antibiotiques

La comparaison des taux de résistance des souches commensales appartenant au groupe A+B1 avant et après traitement a montré des taux de résistance similaires. En plus de la résistance aux quinolones les souches ont présenté un taux de résistance élevé pour le triméthoprime, les associations triméthoprime/sulfaméthoxazole, Sulfamides et tétracyclines (Figure 23).



**Figure 23:** comparaison des taux de résistances vis-à-vis des antibiotiques des souches des groupes A+B1 avant (n= 15) et après (n= 9) traitement.

### DISCUSSION

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 28 souches résistantes à la ciprofloxacine isolées en 2010 à partir des eaux usées et des eaux traitées de la station d'épuration urbaine de Boumerdès. L'objectif de cette étude a été la caractérisation de la phylogénie de ces souches.

Les eaux usées constituent un environnement idéal pour l'émergence de nouvelles souches pathogènes et/ou résistantes par l'acquisition de différents déterminants de virulence et de résistance. L'analyse des bactéries présentes dans les eaux usées peut donc fournir des informations sur le réservoir de gène bactérien qui peut être utile pour prédire les risques pour les populations humaines.

En fait, la présence d' *E. coli* pathogènes dans les milieux aquatiques a déjà été documentés dans plusieurs études (**Garcia-Aljaro et al., 2009**).

Le tableau (3) présente les résultats de la PCR pour l'ensemble des souches en fonction de leurs groupes phylogénétiques. Le gène *ChuA* été présent dans toutes les souches appartenant à des groupes B2 et D et absent dans toutes les souches appartenant aux groupes A et B1 (**Sabate et al., 2008**).

Ce la nous a permis de séparer les groupes B2 et D des groupes A et B1. De la même manière, le gène *yjaA* permet la discrimination parfaite entre le groupe B2 (100 % des souches étaient positives) et le groupe D (100 % des souches étaient négatifs). Le gène *TSPE4.C2* était présent dans toutes les souches sauf les souches du groupe A. Ce groupe est caractérisé par l'absence de ce fragment anonyme (**Clermont et al., 2000**).

Les groupes phylogénétiques des 28 souches étaient comme suit : 14 appartenaient au groupe **A**, 10 appartenaient au groupe **B1**, 2 appartenaient au groupe **D**, et 2 appartenaient au groupe **B2**. En effet, la majorité des souches obtenues à partir d'échantillons des eaux usées et d'eaux traitées, appartenaient au groupe **A** et groupe **B1**. Cela indique que la grande partie des souches d' *E. coli* isolées est commensale et quelles seraient d'origine intestinale (**Clermont et al., 2000**). Tandis que 4 souches seulement appartenaient à au groupe **B2** et au groupe **D**, cela indique que ces souches sont d'origine extra-intestinale et sont considérés parmi les pathogènes. Ces proportions des différents groupes sont en accord avec celles rapportées par Duriez et al. (**2001**) qui a observé que le groupe **B2** est rare alors que les groupes **A** et **B1** sont les plus communs.

L'analyse et la comparaison de *E. coli* isolées à partir des eaux usées peuvent fournir des informations pertinentes sur l'origine et la transmission de pathogènes extra-intestinalerésistantes aux antibiotiques (**Darfeuille-Michaud et Colombel, 2007**).

La comparaison des taux de résistance aux antibiotiques montre que les souches du groupe **A** et **B1** et **D**, en plus de la résistance aux quinolones, elles présentent une résistance élevée aux sulfamides, trimethoprim, trimethoprim/sulfamethoxazole et aux tétracyclines, avec une multi-résistance qui varie de 5 jusqu'à 12. Une souche du groupe **B2** a présenté des résistances aux bêta-lactamines (céfotaxime, céftazidime, et céfépime) avec une multirésistance de 15 molécules. Plusieurs études ont montré que les bactéries commensales sont généralement plus résistantes que les souches pathogènes (**Bonacorsi et al., 2001 ; Figueira et al., 2010**)

Cette étude nous a permis d'identifier les différents groupes phylogénétiques retrouvés au niveau de la station d'épuration et en relation avec la résistance aux quinolones. Nous avons montré que c'est les groupes commensaux qui prédominent avec une multirésistance importante.

*Conclusion*

### CONCLUSION

Le but de ce travail a été la détermination des groupes phylogénétiques de 28 souches d' *E.coli* résistantes aux fluoroquinolones isolées à partir des eaux usées et eaux traitées au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines de la wilaya de Boumerdes.

Les résultats ont montré la répartition des souches sur les 4 groupes phylogénétiques avec une prédominance des groupes commensaux (A et B), les groupes pathogènes ont été très faiblement représentés avec deux souches pour chacun des deux groupes (Det B2).

La comparaison groupe phylogénétique et résistance aux antibiotiques a montré que les groupes commensaux sont les plus multi-résistant.

Même si la présence des souches pathogènes n'est pas élevée dans les eaux usées, leurs présence dans l'eau usée traitée peut être considéré comme un problème de santé publique. Par conséquent les perspectives pour compléter cette étude sont les suivants :

- Faire une surveillance pour déterminer les différentes populations d'*E.coli* existantes dans notre environnement, sachant quelle peut être spécifique selon la répartition géographique.
- Aller plus loin dans la détermination de l'origine des souches par la détermination des MLST.
- Contrôle de la qualité des eaux traitées avant leur réutilisation pour l'irrigation.

*Références*

*Bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

**Andrade J.R., Veiga D., V.F., Rosa D.S., et Suassuna, I. 1989.** An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 28: 49-57.

**Arlette D-M., Colombel J-F., 2007.** Pathogenic *Escherichia coli* in inflammatory bowel diseases Proceedings of the 1st International Meeting on *E. coli* and IBD, Lille, France

### B

**Bertin A., Girardeau J.P., Darfeuille-michaud A. 2000.** Epidemiological study of *pap* genes among diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap31A fimbriae. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1502-1509.

**Bonacorsi S., Houdoin E., 2001.** Facteurs de virulence associés & *E. coli* responsable de meningite neonatale Bingen. Service de microbiologie, hôpital Robert-Debrd, 48, boulevard serurier, 75019 Paris, France. *Arch Pédiatr* 2001 ; 8 Suppl 4 : 726-31.2001  
l'éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.

**Branguet T., Schneider R. J., Färber H. A., Skutlarek D., Meyer M. T. et Goldbach, H. E. 2003.** Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31(1), 36–44.

**Brenner D. , Fanning G. , Miklos G. et Steigerwalt A. 2003.** Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int J Syst Bacteriol* 23: 1-7.

### C

**CA-SFM. 2010.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2010. <http://www.sfm.asso.fr>. 50p.

**Chalmers R.M., Aird H. et Bolton F.J. 2000.** Waterborne *Escherichia coli* O 157. *Journal of Applied Microbiology*, 88(supplément): 124S-132S.

**Clermont O., Bonacorsi S. et BINGEN E. 2000.** Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *applied and environmental microbiology*, 0099-2240 Oct. 2000, p. 4555–4558 Vol. 66, No. 10.

**Collyne F. et Simonet M. 2006.** *Escherichia coli* une bactérie modèle pour appréhender l'émergence des agents infectieux. Inserm U801 – Université de Lille II – Institut Pasteur de Lille, 1, rue du professeur Calmette, F-59019 Lille.

**Cookson S.T. et Nataro J.P., 1996.** Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb Pathol* 21: 421-434.

**Courvalin P., Goldstein F., Filippon A et Sirot J. 1985.** L'antibiogramme, 1<sup>ère</sup> édition. MCP édition, Paris.

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

## D

**Dupray E. et Derrien A., 1994.** Influence du passage de *Salmonella spp.* Et *E.coli* en eaux usées sur leur survie ultérieure en eau de mer. Ifremer, centre de brest, laboratoire microbiologie del, b.p. 70, 29280 plouzan 6, France

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

## E

**Edberg, SC, Rice E.W., Karlin R.J. et Allen M.J. 2000.** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 106S-116S.

## F

**Figuiere M., Penn C.W. et Pallen M.J. 2010.** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multi-copy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6157-6181.

**Flaudrois J. P. 2004.** Bactério Géné/ croissance bactérienne Cours de Bactériologie Médicale DCEM1 UFR Médecine Lyon Sud- Laboratoire de Biométrie, Biologie Evolutive UMR 5558. (2004) : 1, 3, 10.

## G

**Garcia-Aljaro C., Moreno E., Andreu A., Prats G., Blanch A-R. 2009.** Phylogroups, virulence determinants and antimicrobial resistance in stx2 gene-carrying *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *Research in Microbiology* **160** (2009) 585e591

**Guardabassi L., Danilo M.A., Lo Fo Wong., Dalsgaard A., 2002.** The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*, **36**: 1955–1964.

**Gerardin J., Lalioui L., Jacquemin E., Le bouguenec C., Mainil J. 2000,** The *afa*-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa-8* variant. *Vet. Microbiol.*, **76**, 175-184.

**Girardeau J.P., Lalioui L., OU Said A.M., Dechamps C., Le bouguenec C. 2003.** Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon : Evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 218-226.

## H

**Hacker J., Kaper J.B. 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 641- 679.

## J

**Jaurguy L. H., Araújo A. N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C. et Montenegro M. 2008.** Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 45–95.

**Jerse A.E., Yu J., Tall B.D. et Kaper J.B. 1990.** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7839-7843.

**Johnson J.R., O'Bryan T.T., Kuskowski M.A., Maslow J.N. 2001.** Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and papA alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse source bacteremia. *Infect Immun* 69:

**Johnson J.R. 2000.** Shigella and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J Med Microbiol* 49: 583-585.

## K

**Kaper J.B., Nataro J.P. et Noble H.L. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli* *Nat Rev microbiol* 2 : 123-140.

**Katarzyna B.C., Paweł M., Michał S. 2008.** Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary Microbiology* 131 (2008) 173–184.

**Khan A.S., Kniep B., Oelschlaeger T.A., Van die I., Korhonen T., Hacker J. 2000.** Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **68**, 3541-3547.

## L

**Levine, M.M. 1987.** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* **155**: 377-389.

**Lobril J. R. 1998.** Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse Université de Lyon I, France. (1998) : 42, 77.

## M

**Machado J., Grimont F., Grimont P.A.D. 2000.** Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene, *Res. Microbiol.*, (2000) 151 : 535-546.

**Maguin E. 1998.** Organismes génétiquement modifiés Mémoire de maîtrise et Sciences Vétérinaires en Microbiologie Immunologie, Nantes. *Mol. Biol. Rev.* 61: 377-92.

**Mainil J., 2003.** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : les adhésines et facteurs de colonisation. Ann. Méd. Vét., 2003, **147**, 105-126

**McMath S.M. et Holt D.M . 2000.** The fate of *Escherichia coli* through water treatment. Nature Reviews Microbiology, 4:608-620.

#### N

**Nataro J. P. et Kaper J. B. 1998.** Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11:142-201.

**Nougayrède. J-P. , Oswald. É .2011.** Microbiota and colorectal cancer : genotoxic bacteria in the intestinal tract Key-words (Index medicus) : Colorectal neoplasms. ESCHERICHIA COLI. Bull. Acad. Natle Méd., 2011, 195, no 6, 1295-1305, 14 juin 2011.

#### P

**Picard B., Garcia J.S., gouriou S., Durez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J. et Denamur E. 1999 .** the link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect. Immun. 67, 546-553.

#### R

**Ray b L., Raet Z.C.R. 2000.**The biosynthesis of gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A. *J. Biol. Chem.*, , **262**, 1122-1128.

#### S

**Sabaté M., Prats G., Moreno E., Balleste E., Blanch A- R., Andreu A., 2008.** Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. Microbiology Service, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Auto`noma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain . Department of Microbiology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

**Sambrook J., Fritsh E. F. et Maniatis T. 1989.** Molecules cloning: a laboratory manual. *ASM News*, **67**, 15-20.

**Savoie F. 2011.** Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* Producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments. thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne. Discipline : Sciences de la vie. Spécialité : Microbiologie

**Stordeur P., Marlier D., Blanco J., Oswald E., Biet F., Dho-moulin M., Mainil J. 2002.** Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microbiol.*, **84**, 231-241

**Sylvie M. 2010.** Facteur de virulence de *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn :caracterisation et regulation de leur expression ; these de doctorat , microbiologie , universite BLAISE PASCAL.356p

**Szalo I.M., Taminiau B., Mainil J. 2006.** Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles . Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service de Bactériologie et Pathologie des Maladies bactériennes, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B43A, 4000 Liège, Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 2006, **150**, 108-124.

## T

**Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., et Denamur E. 2010.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews: Microbiology*, 8(3), 207–217.

**Thomas C.M., Neilsen K.M. 2005.** Mechanisms of, and barrier to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat microbial Rev* 2005;3:722-721.

**Thomas R.J. et Johnson A.L. 2003.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 181: 261-272.

**Touchon M. 2009.** Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, 5(1), p.e1000344.

## V

**Vial P. A., Robins-Browne R., Lior H., Prado V., Kaper J. B., Nataro J. P., Maneval D., Elsayed A. et Levine M. M. 1988.**Characterization of enteroadherentaggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 158:70-79.

**Vieira G. 2011.** Etude de la diversité métabolique dans l'espèce *Escherichia coli* a l'aide de réseaux et de modèle du métabolisme a l'échelle de l'organisme. Thèse de doctorat , université de Evry Val d'Essonne. 260p.

## W

**Walker C., Lykkesfildt j., Svendsen O. et Aarestrup F.M . 2009.** The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinilone resistance among salmonella and coliforms in pigs *Research in veterinary science*, 75 (2003), 185-193.

**Watnick P., et Kolter R., 2000.** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182:2675-9.

## Z

**Zhang W., Bielaszeweska M. 2000.** The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the total environment*, 407(8), 2711–2723.

# *Annexes*

## ANNEXES

**Tableau 1 :** distribution des groupes phylogéniques par rapport au pourcentage de résistance

	n total	N EF	N ET	% Total/28	% EF/16	%ET/12
A	14	9	5	50	56,25	41,67
B1	10	6	4	35,71	37,5	33,33
D	2	1	1	7,14	6,25	8,33
B2	2	0	2	7,14	0	16,67

**Tableau 2:** profile d'antibiorésistance

antibiotype	N de souches R
5	1
6	1
7	1
8	2
9	6
10	7
11	5
12	1
15	1

**Tableau 3:** répartition des souches selon les groupes phylogénétiques et la nature des eaux.

Groupe	nombre de souches	EF	ET
A	14	9	5
B1	10	6	4
D	2	1	1
B2	2	0	2

**Tableau 4:** taux de résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques.

ATB	groupe A/14		groupe B1/10		groupe D/2		groupe B2/2	
	N de R	taux de R	N de R	taux de R	N de R	taux de R	N de R	taux de R
OFX	14	100	10	100	2	100	2	100
NA	14	100	10	100	2	100	2	100
CIP	14	100	10	100	2	100	2	100
NOR	14	100	10	100	2	100	2	100
PEF	14	100	10	100	2	100	2	100
ATM	0	0	0	0	0	0	1	50
IMP	0	0	0	0	0	0	0	0
FOX	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX	0	0	1	10	0	0	1	50
CAZ	0	0	0	0	0	0	1	50
FEP	0	0	0	0	0	0	1	50
AMC	0	0	0	0	0	0	0	0
K	11	78,57	2	20	2	100	1	50
AN	0	0	0	0	0	0	0	0
GN	1	7,14	0	0	0	0	0	0
TMP	14	100	5	50	1	50	2	100
SXT	14	100	5	50	1	50	2	100
SSS	13	92,86	7	70	2	100	2	100
TE	14	100	8	80	2	100	2	100
C	4	28,57	1	10	1	50	1	50
RA	3	21,43	6	60	2	100	0	0

**Tableau 5 : distribution des nombres de résistance avant et après traitement**

Nombre de R	N EF	N ET
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	1
6	1	0
7	0	1
8	0	1
9	2	4
10	8	1
11	3	3
12	2	0
13	0	0
14	0	0
15	0	1
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0	0
21	0	0

**Tableau 6:** comparaison des taux de résistance avant et après traitement.

Les antibiotiques	EF	ET
OFX	15	9
NA	15	9
CIP	15	9
NOR	15	9
PEF	15	9
ATM	0	0
IMP	0	0
FOX	0	0
CTX	0	1
CAZ	0	0
FEP	0	0
AMC	0	0
K	9	4
AN	0	0
GN	1	0
TMP	13	6
SXT	13	6
SSS	14	6
TE	14	8
C	3	1
RA	5	3

Tableau 7: antibiogramme de souches sélectionnées

Nom de souche	identification	Quinolones					Béta-lactamines							Aminosides			Sulfamide-triméthoprimes			titracyclines	phénols	divers
		OFX ]22,27 ]	NA ]15,20 ]	CIP ]22,25 ]	NOR ]22,25 ]	PEF ]16,22 ]	ATM ]2127 ]	IMP ]17,24 ]	FOX ]15,22 ]	CTX ]23,26 ]	CAZ ]19,26 ]	FEP ]17,24 ]	AMC ]16,19 ]	K ]17,17 ]	AN ]15,17 ]	GM ]16,18 ]	TMP ]13,16 ]	SXT ]13,16 ]	SSS ]12,17 ]	TE ]17,19 ]	C ]23,23 ]	RA ]14,19 ]
EF1	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	12 R	8 R	8 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	25 S	26 S	0 R	0 R	0 R	9 R	29 S	15 I
EF2	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	0 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	25 S	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	22 R	15 I
EF3	<i>E.coli</i>	13 R	0 R	15 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	25 S	26 S	0 R	0 R	0 R	8 R	11 R	17 R
EF4	<i>E.coli</i>	11 R	0 R	14 R	25 I	11 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	8 R	28 S	16 I
EF5	<i>E.coli</i>	10 R	0 R	13 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	26 S	24 S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	15 I
EF6	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	26 S	27 S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	9 R
EF7	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	0 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	27 S	27 S	0 R	0 R	0 R	9 R	30 S	18 I
EF8	<i>E.coli</i>	12 R	0 R	13 R	10 R	11 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	26 S	27 S	0 R	0 R	0 R	7 R	25 S	15 I
EF9	<i>E.coli</i>	10 R	0 R	12 R	0 R	0 R	S	S	S	>40 S	33 S	S	S	0 R	26 S	26 S	0 R	0 R	0 R	8 R	30 S	9 R
EF10	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	24 S	25 S	28 S	0 R	0 R	0 R	9 R	33 S	8 R
EF11	<i>E.coli</i>	10 R	0 R	12 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	0 R	22 S	23 S	0 R	0 R	0 R	0 R	29 S	19 I
EF12	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	36 S	37 S	30 S	39 S	32 S	>40 S	S	23 S	22 S	24 S	S	34 S	29 S	30 S	31 S	11 R
EF13	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	0 R	0 R	0 R	S	S	S	S	S	S	S	23 S	25 S	26 S	0 R	0 R	0 R	9 R	29 S	18 I

EF14	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	37 S	>30 S	27 S	34 S	32 S	35 S		24 S	25 S	26 S	0 R	0 R	0 R	0 R	26 S	16 I
EF15	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	0 R	0 R	0 R								25 S	24 S	25 S	0 R	0 R	0 R	8 R	30 S	12 R
EF16	<i>E.coli</i>	12 R	0 R	12 R	0 R	0 R		38 S	32 S		25 S			20 S	22 S	23 S	29 S	18 S	0 R	9 R	27 S	14 R
ET1	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	15 R	>40 S	22 I	0 R	16 R	16 R		0 S	22 S	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	11 R	15 I
ET2	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	0 R	0 R	0 R	26 S	37 S	31 S	18 R	27 S	25 S		23 S	26 S	24 S	30 S	22 S	0 R	7 R	27 S	16 I
ET3	<i>E.coli</i>	10 R	0 R	11 R	0 R	0 R								0 R	26 S	25 S	30 S	22 S	0 R	0 R	30 S	10 R
ET4	<i>E.coli</i>	10 R	0 R	12 R	0 R	0 R								0 R	25 S	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	16 I
ET5	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	40 S	36 S	30 S	40 S	33 S	37 S		0 S	25 S	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	17 I
ET6	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R								0 R	25 S	24 S	0 R	0 R	0 R	0 R	25 S	14 R
ET7	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R								24 S	24 S	26 S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	15 I
ET8	<i>E.coli</i>	11 R	0 R	12 R	0 R	0 R								0 R	28 S	27 S	0 R	0 R	23 S	8 R	30 S	19 I
ET9	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	0 R	0 R	0 R			33 S					24 S	24 S	25 S	0 R	0 R	0 R	9 R	30 S	20 S
ET10	<i>E.coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R								22 S	25 S	25 S	0 R	0 R	0 R	7 R	30 S	18 I
ET11	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	0 R	0 R	0 R			>30 S					24 S	24 S	24 S		32 S	30 S	29 S	30 S	19 I
ET12	<i>E.coli</i>	8 R	0 R	12 R	0 R	0 R	35 S	37 S	30 S	35 S	28 S	35 S		21 S	24 S	24 S	30 S	30 S	28 S	7 R	26 S	0 R

**Tableau 8:** tableau d'identification de souches sélectionnées

souche	Test																				Identific- ation	Nom de la souche
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VIP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA		
EF1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
EF2	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
EF3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
EF4	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	<i>E.coli</i> Excellente id 99.9%
EF5	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
EF6	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	5044152	<i>E.coli</i> bonne id 97.2%
EF7	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
EF8	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
EF9	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044553	<i>E.coli</i> bonne id 94.7%
EF10	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	5044553	<i>E.coli</i> bonne id 94.7%
EF11	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	<i>E.coli</i> Excellente id 99.9%
EF12	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> 99.8% très bonne id genre
EF13	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5104552	<i>E.coli</i> bonne id 93.7%
EF14	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%

EF15	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	1044572	<i>E.coli</i> id acceptable 86.2%
EF16	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
ET1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
ET2	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
ET3	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
ET4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	1044572	<i>E.coli</i> id acceptable 86.2%
ET5	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
ET6	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	<i>E.coli</i> Excellente id 99.9%
ET7	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	5144512	<i>E.coli</i> bonne id 98.1%
ET8	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
ET9	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	5144512	<i>E.coli</i> bonne id 98.1%
ET10	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	<i>E.coli</i> Excellente id 99.9%
ET11	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	5044142	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
ET12	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne 99.8%