



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE
Spécialité : Génétique Fondamentale et Appliquée

Par
Farah Nesrine
&
Belhachemi Souhila

Thème :

**ELABORATION DES AMORCES DU GENE RPSL EN VUE DEL'ETUDE
 DE LA RESISTANCE D'E.coli AUX ANTIBIOTIQUES**

Soutenue le 12/06/2024 devant le jury composé de :

- | | | |
|---------------------|---------------------------|--|
| Président | Abdelwaheb CHIBANI | Professeur Université de Mostaganem |
| Encadreur | Nabila BRAHAMI | MCA Université de Mostaganem |
| Examinatrice | Chahinez DAHMANI | MCB Université de Mostaganem |

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah, le Tout-Puissant, qui nous a éclairés sur le chemin du savoir et nous a donné le courage et la volonté d'effectuer ce travail.

Nous remercions notre encadreur, **Dr. BRAHAMI Nabila**, pour ses orientations, sa patience et surtout sa confiance et nous lui remercions pour sa grande disponibilité et ses précieux conseils.

Nos sincères remerciements vont également aux membres du jury Mr **Abdelwaheb CHIBANI** et M^{elle} **Chahinez DAHMANI** pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre famille, notamment nos parents pour leur contribution, leur collaboration et leur soutien, sans oublier la patience dont ils ont fait preuve tout au long de notre cursus et leur encouragement.

Dédicace

Je dédie ce précieux travail aux êtres les plus chers au monde, à qui je témoigne mon amour. C'est de vous dont je parle, très chers parents.

Merci *mon père* pour tous tes efforts consentis pour ma réussite. Tu as mis tout ce que tu possédais pour m'apprendre le sens de l'honneur, de la dignité, de la morale, et du travail bien fait

Ma mère, j'ai enfin compris ton combat, tes paroles incessantes qui avaient pour but ma réussite et mon épanouissement. J'espère être à la hauteur et ne jamais te décevoir. Que Dieu te prête longue vie afin que tu puisses savourer avec moi les fruits de tes sacrifices.

À mon encadreur *Mme BRAHAMI N*, pour m'avoir dirigé dans ce travail de recherche et m'avoir fait bénéficier de son expérience et de ses précieux conseils.

À *mes frères et sœurs*, et à toute la famille *Farah*

À tous mes amis qui m'ont toujours soutenu et tous mes amis de la
Promotion 2024.

Sans oublier mon binôme, *Souhila*, avec qui j'ai élaboré mon projet de fin d'études. Et enfin, à tous ceux qui m'apprécient à ma juste valeur.

Nesrin

Dédicace

Avec l'aide d'Allah, le Tout-Puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

À MES TRÈS CHERS PARENTS

Aucune phrase, aucun mot ne saurait exprimer à sa juste valeur le respect
et l'amour que je vous porte.

Sans vos précieux conseils, vos prières, votre générosité et votre dévouement,

Je n'aurais pu surmonter le stress de ces longues années d'étude.

Vous êtes pour moi l'exemple de droiture, de lucidité et de persévérance.

À travers ce modeste travail, je vous remercie et prie Dieu, le Tout-Puissant,

Qu'Il vous garde en bonne santé et vous procure une longue vie pour

Que je puisse vous combler à mon tour.

À *MES FRÈRES* ET *MES SŒURS*

À TOUTE MA FAMILLE *BELHACHEMI*

À TOUS *MES ENSEIGNANTS*

Du primaire, secondaire, et de la faculté de biologie.

À MES CHERS AMIS ET COLLÈGUES

À tous les moments que nous avons passés ensemble, à tous nos souvenirs !

Je vous souhaite à tous une longue vie pleine de bonheur et de prospérité.

À MON BINÔME NESRIN Avec qui j'ai élaboré mon projet de fin d'études.

Et enfin, à tous ceux qui m'apprécient à ma juste valeur.

Souhila

Résumé

Ce travail propose une approche innovante pour étudier la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* en se concentrant sur le gène *RPSL*, qui joue un rôle crucial dans ce processus. L'étude utilise des outils bio-informatiques pour concevoir des amorces spécifiques et efficaces pour la PCR (réaction en chaîne par polymérase), une technique fondamentale en biologie moléculaire.

Dans un premier temps, des ressources comme le National Center for Biotechnology Information (NCBI) et l'outil Primer-BLAST ont été utilisées pour concevoir une série d'amorces candidates ciblant le gène *RPSL*. Ensuite, les paires d'amorces les plus prometteuses ont été sélectionnées sur la base de critères stricts, notamment la spécificité, la longueur optimale et la température de fusion adéquate. Cette méthode a permis de sélectionner des amorces spécifiques pour l'amplification du gène *RPSL*.

La paire d'amorces sélectionnée répond aux normes internationales avec une température de fusion de 59°C, une longueur de 20 nucléotides et un produit d'amplification spécifique de 494 paires de bases, sans produits non spécifiques. Cette précision garantit l'efficacité et la fiabilité des résultats obtenus lors de l'amplification et du séquençage du gène *RPSL*, permettant ainsi une identification précise des mutations responsables de la résistance aux antibiotiques.

Mots clés : *le gène RPSL- NCBI- Primer-BLAST- Amorces- Amplification- nucléotides.*

Abstract

This work proposes an innovative approach to study antibiotic resistance in *E. coli*. *E. coli* resistance to antibiotics was investigated by focusing on the *RPSL* gene, which plays a crucial role in this process. In this study, we utilized bioinformatics tools to design specific and efficient primers for Polymerase Chain Reaction (PCR), a fundamental technique in molecular biology. Initially, resources such as the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the Primer-BLAST tool were employed to design a series of primer candidates targeting the *RPSL* gene. Subsequently, we selected the most promising primer pairs based on stringent criteria, including specificity, optimal length, and appropriate melting temperature. We successfully identified primer pairs for amplifying the *RPSL* gene, with primer pair 2 meeting international standards (melting temperature: 59°C, length: 20 nucleotides, specific product: 494 base pairs, no non-specific products).

Keywords: *The RPSL gene-NCBI- Primer-BLAST-Primers-Amplification- Nucleotides.*

ملخص

يقترح هذا العمل نهجًا مبتكرًا لدراسة المقاومة في بكتيريا الإشريكية القولونية. تم تحويل الإشريكية القولونية إلى مضادات حيوية من خلال التركيز على جين RPSL، الذي يلعب دورًا حاسمًا في هذه العملية. في هذه الدراسة، استخدمنا أدوات المعلوماتية الحيوية لتصميم بادئات محددة وفعالة لتفاعل البوليميراز المتسلسل، وهي تقنية أساسية في البيولوجيا الجزيئية. استخدمنا أولاً موارد مثل المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) وأداة Primer-BLAST لتصميم سلسلة من الأشعال المرشحة التي تستهدف جين RPSL. بعد ذلك، اخترنا أزواج التمهيدي الواعدة بناءً على معايير صارمة، بما في ذلك الخصوصية والطول الأمثل ودرجة حرارة الانصهار المناسبة. تمكنا من اختيار الأشعال لتضخيم جين RPSL. الحصول على زوج تمهيدي محدد 2. يتوافق هذا الزوج التمهيدي مع المعايير الدولية (درجة حرارة الانصهار: 59°C، الطول: 20 نيوكليوتيدات، منتج محدد: 494 نقطة أساس، لا توجد منتجات غير محددة).

الكلمات المفتاحية: جين RPSL-NCBI- Primer-BLAST-Primers-Amplification-
.Nucleotides

Liste des figures

Figure 1: Principaux mécanismes d'action des antibiotiques	6
Figure 2: Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux antibiotiques	9
Figure 3: Escherichia coli sur milieu de Mac Conkey	20
Figure 4: E.Coli sous microscope électronique et après coloration de Gram	22
Figure 5: Les modes de transmissions de la bactérie E.coli.....	27
Figure 6: La base de données «National Center for Biotechnology Information (NCBI) »	44
Figure 7: La base de données «NCBI».	45
Figure 8: L'outil Primer BLAST	46
Figure 9: La numération des bases.....	46
Figure 10: Utilisation du Logiciel primer-BLAST	47
Figure 11: Vu graphique des résultats (paires d'amorces).	49
Figure 12: Choix de la paire 2 parmi les résultats de primer BLAST.....	49
Figure 13: Position des amorces directe et inverse dans la séquence du gène RPSL.	50

Liste des tableaux

Tableau 1: Les quinolones.	12
Tableau 2: Les aminosides.....	13
Tableau 3: Les fosfomycines	14
Tableau 4: Les rifamycines	15
Tableau 5: La classification d'E.coli selon le Bergeys manual 2012	18
Tableau 6: Caractère culturaux d'E.COLI sur les milieux (Minh-DuyPhan,2022).....	20
Tableau 8: Caractéristique de croissance d'E.Coli.	21
Tableau 9: Les trois étapes différentes de PCR	37
Tableau 10: Caractéristiques de la paire d'amorce choisis.....	50

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : adénosine momophosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BMR : Bactéries Multi Résistantes

BN : Bouillon Nutritif

E. coli : *Escherichia coli*

ECBU : Etude cytobactériologique des urines

G : Gram

GN : Gélose nutritive

NCBI : National Center for Biotechnology Information

RPSL : RIBOSOMAL PROTEIN US12 LOCUS

PCR: réaction de polymérisation en chaîne

Table des matières

Dédicace.....	
Remerciements	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures	
Introduction Générales	1
Chapitre 1 : Résistance bactérienne	4
1. Historique	4
2. Généralités sur les antibiotiques	4
3. Types de résistance aux antibiotiques.....	5
3.1 Résistance naturelle (intrinsèque)	5
3.2 Résistance acquise (extrinsèque)	5
a) Les résistances chromosomiques.....	5
b) La résistance par acquisition de gènes	6
3.3 Mode d'action des antibiotiques	6
4. Mécanisme de résistance aux antibiotiques	6
A. Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	7
• Classe A :.....	7
• Classe B :.....	7
• Classe C:.....	7
• Classe D:.....	7
B. Diminution de perméabilité	7
C. Altération (ou modification) des sites de liaison	8
D. Efflux actif.....	8
E. Résistance inductible	8
F. Acquisition d'un déterminant de résistance exogène	8
5. Mécanisme de résistance d'E.coli aux différentes familles d'antibiotiques	9
1) Les Bétalactamines.....	10
A. Les pénicillinases	10
B. Les céphalosporinase.....	10
C. Carbapénèmases	11
2) Les quinolones	11
3) Les aminosides	12
4) La fosfomycine.....	14
5) Rifamycine	15

6.	Généralités sur Escherichia coli.....	17
6.1	Historique découvert et taxonomie	17
6.2	Habitat	17
6.3	Classification des E. coli responsables des troubles intestinaux.....	18
	□ Les E. coli Entérotoxigènes (ETEC).....	18
	□ Les E. coli Enteropathogènes (EPEC).....	18
	□ Les E. coli Entéroaggrégatifs (EAEC).....	19
	□ Les E. coli Entéroinvasifs (EIEC).....	19
	□ Les E. coli à adhésion diffuse (DAEC).....	19
	□ Les E. coli Enterohémorragiques (EHEC).....	19
6.4	Caractères bactériologiques.....	19
6.4.1	Caractères bactériologiques et cultureux	19
1)	Caractères morphologiques	2
2)	Caractères biochimiques.....	22
3)	Caractères antigéniques	23
	b) Antigènes protéiques.....	23
	a) Antigène M.....	23
	b) Antigènes H.....	23
	c) Antigène B.....	23
4)	Pouvoir pathogène.....	24
5)	Pathologies associées aux EHEC.....	24
	a) La colite hémorragique	24
	b) Le SHU (Syndrome Hémolytique et Urémique).....	24
	c) Le PTT (Purpura Thrombotique Thrombocytopénique)	25
6)	Facteurs de Pathogénicité	25
	I. Capsule	26
	II. Les adhésines.....	26
	III. Toxines	26
7)	Caractères phénotypiques.....	26
7.	Epidémiologie humaine	27
	a. Les modes de transmission	27
7.1.	Les infections urinaires (IU).....	28
8.	Le gène <i>RPSL</i>	30
8.1	Génome de la souche E. coli K12 MG1655	30
8.2	La PCR (Polymerase Chain Reaction).....	35
8.3	Principe.....	35

a) L'ADN	36
b) Les deux amorces	36
c) Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).....	36
d) L'enzyme, Taq polymérase.....	36
e) Le milieu réactionnel.....	36
9. Les types de la PCR :	39
1) PCR multiplexe.....	39
2) Méta-PCR	39
3) PCR asymétrique	39
4) PCR quantitative	39
5) PCR semi-quantitative	39
6) PCR en temps réel (RT-PCR).....	39
7) PCR digitale (dPCR).....	39
8) PCR à point chaud (Hot Start PCR).....	40
9.1 Technologies de détection	40
9.2 Applications	40
Matériels et méthodes	
Matériels et méthodes	42
1.1 Objectif.....	42
1.2 But	42
1.3 La séquence du gène RPSL	42
1.4 L'amorce spécifique du gène RPSL.....	43
Résultats et Discussion	
1. Choix de la paire d'amorces	43
2. Interprétation des résultats.....	51
3. Confirmation des résultats.....	51
4. Les outils utilisés dans cette recherche.....	51
Conclusion	47
Références Bibliographiques	49

INTRODUCTION

Introduction

La résistance aux antibiotiques représente un enjeu majeur pour la santé publique à l'échelle planétaire. De plus en plus, les bactéries pathogènes, comme *Escherichia coli* (*E. coli*), développent des mécanismes de résistance qui rendent les traitements classiques moins efficaces et augmentent les risques de propagation d'infections difficiles à traiter (OMS,2014).

Dans l'intestin humain et animal, *E. coli*, une bactérie commune, peut devenir pathogène et provoquer différentes infections, telles que des infections urinaires, des gastro-entérites et des septicémies. L'acquisition et la transmission de gènes de résistance aux antibiotiques par cette bactérie représentent un défi majeur pour la gestion des maladies infectieuses (Richard et Guennadi ;2008). Les études de résistance aux antibiotiques utilisent souvent le gène *rpsL* codant pour la protéine ribosomale S12. On sait que les mutations présentes dans ce gène sont responsables d'une résistance à l'antibiotique aminoglycoside streptomycine. En analysant les mutations du gène *rpsL*, on peut ainsi approfondir notre compréhension des mécanismes de résistance et repérer les souches résistantes (Price R,2016).

Le gène ribosomal protein uS12 *Locus (RPSL)* est souvent utilisé dans ces études car il joue un rôle clé dans la résistance aux antibiotiques. Les amorces du gène *rpsL* sont élaborées pour permettre l'amplification spécifique de ce gène lors de la réalisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette amplification permet ensuite d'étudier la présence et la nature des mutations qui pourraient être responsables de la résistance aux antibiotiques (Riley, M. et al.,2006).

Il est important de noter que l'élaboration des amorces du gène *rpsL* et l'étude de la résistance aux antibiotiques nécessitent une expertise en biologie moléculaire et en microbiologie. Les résultats de ces études peuvent contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux antibiotiques et à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques (Nichols et al., 1998).

Notre thème de recherche est intitulé : « **ÉLABORATION DES AMORCES DU GÈNE RPSL EN VUE DE L'ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE D'E. COLI AUX ANTIBIOTIQUES** ».

Nous avons opté pour une approche visant à concevoir des amorces pour le gène *rpsL*, essentielle pour amplifier ce gène et analyser les variants responsables dans la résistance d'*E. coli* aux antibiotiques.

INTRODUCTION GENERALES

Cette analyse permet de choisir des régions optimales pour la conception des amorces.

L'objectif de notre travail est d'exploiter des outils de la bio-informatique afin de concevoir des amorces spécifiques encadrant le gène *RPSL*, impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez la bactérie *Escherichia coli*.

Notre travail sera scindé en deux parties :

Les deux chapitres de la première partie portent sur la résistance aux antibiotiques. Tout d'abord, nous avons examiné les concepts généraux de la résistance bactérienne, puis nous avons examiné la description et la compréhension de la bactérie *E. coli*, et un deuxième chapitre intitulé « Le gène *RPSL* » sera consacré à l'exploration des tests tels que la PCR, etc...

La deuxième partie de notre recherche comprend deux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré aux matériels et méthodes.
- Le second chapitre, intitulé « Analyse et interprétation des résultats », est dédié à l'expérimentation et à la collecte des résultats, en exposant le contexte global de notre gène.

Enfin, notre recherche se conclura par une conclusion générale dans laquelle nous présenterons les résultats obtenus et les perspectives de cette étude.

CHAPITRE I

Chapitre 1 : Résistance bactérienne

L'agent infectieux le plus courant chez l'homme est *Escherichia coli*. La multirésistance est la résistance de certaines souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques.

Aujourd'hui, la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. (**Liazid A,2012**).

1. Historique

Dès 1877, Pasteur et Joubert mettent en évidence la notion d'antagonisme microbien (antibiose) : des cultures de bactéries charbonneuses poussent mal lorsqu'elles sont souillées par certaines bactéries saprophytes (**Pasteur, L.& Joubert,1877**).

En 1889, Vuillemin crée le terme d'antibiose (anti=contre, biose =vie) action exercée par les substances antibiotiques (**Vuillemin,1889**).

En 1912, Vandenner montra que les extraits obtenus à partir de *Aspergillus fumigatus* avaient une activité anti-staphylococcique.

En 1928, Fleming découvre la pénicilline (**Fleming ,1929**).

Entre 1938-1942, la pénicilline G est purifiée et utilisée en clinique par H. Florey, E. Chain. En 1940, le terme d'antibiotique a été proposé par R. Dubos.

En 1940, Waksman isole l'actinomycète produite par un streptomyces et il découvre la Streptomycine active en particulier sur le bacille de Koch (**Waksman, & Woodruff ,1940**).

A partir de cette date, de nombreux antibiotiques ont été découvert :

: Chloramphénicol, Tétracyclines en 1949, Aminosides en 1950, Macrolides en 1952, Glycopeptides en 1958, Streptogramines en 1962, Triméthoprimine en 1970 et Oxazolidinones en 2000 (**Boulaahbal, 2009**).

2. Généralités sur les antibiotiques

Le terme "antibiotique" signifie « agent agissant contre les microorganismes ». Lorsqu'un microorganisme continue à se multiplier ou tout simplement survit en présence d'une concentration d'antibiotiques normalement capable d'inhiber ou de tuer les individus de la même espèce, alors il y a résistance. Dans le cas contraire, l'organisme est dit sensible (**Sabtu, Enoch et al. 2015**).

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules humaines dans notre propos). Ils permettent aux défenses naturelles du corps tel que le système immunitaire, de les éliminer. Ils agissent

Souvent en inhibant la synthèse de protéines, l'ADN, l'ARN, par un agent désorganisant la membrane, ou d'autres actions spécifiques (**Levy SB,2004**). Les sources principales d'antibiotiques sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries.

3. Types d'antibiotiques

Selon (**Duval et Soussy, 1990 ; Fontaine, 1992**) La classification des antibiotiques peut se faire selon leur origine (naturelle ou de synthèse), leur mécanisme d'action sur la bactérie, leur spectre d'activité ou encore leur nature chimique. Les principaux mécanismes d'action que l'on peut rencontrer diffèrent selon la molécule considérée. Ainsi, les antibiotiques peuvent agir, entre autres, sur (**Figure 1**) :

- **(1) la paroi bactérienne** : Certains antibiotiques bloquent la synthèse d'éléments de la paroi bactérienne, dont le rôle est de maintenir la pression osmotique et protéger la bactérie du monde extérieur. La membrane de la cellule est alors fragilisée, et la lyse bactérienne survient. Ce blocage confère une activité bactéricide. Ce mécanisme entre en jeu pour les bêta-lactamines, comme les pénicillines ou les céphalosporines, la fosfomycine, ou encore les glycopeptides, comme la vancomycine (**Lévi Y ;2006**).
- **(2) la membrane interne** : D'autres agissent sur l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie, qui permet de retenir les éléments nécessaires à sa survie dans le cytoplasme, et de maintenir un gradient chimiosmotique. Les antibiotiques peuvent agir sur cette membrane de deux façons : en désorganisant sa structure, ou en formant un canal dans la membrane, entraînant la fuite des composés cellulaires. On retrouve ce procédé chez les polymyxines par exemple (**Lévi Y ;2006**).
- **(3) le génome bactérien** : Les antibiotiques peuvent aussi bloquer la réplication de l'ADN bactérien ou la transcription de l'ADN en ARN, suivant différents mécanismes. Pour cela, ils doivent pénétrer dans la cellule et interrompre un élément de la chaîne de réplication. Ce processus concerne les quinolones ou la rifamycine
- **(4) la synthèse protéique** : D'autres inhibent la synthèse des protéines, essentielle à la survie de la cellule. L'antibiotique pénètre dans la cellule, et bloque le ribosome bactérien, structure du cytoplasme nécessaire à la synthèse des protéines. De nombreux antibiotiques fréquemment utilisés ont pour cible le ribosome, comme les aminosides, les cyclines, ou les macrolides (**Lévi Y ;2006**).
- **(5) la synthèse des folates** : certains antibiotiques inhibent la synthèse des folates, éléments essentiels à la formation de constituants nécessaires à la survie cellulaire : lipides, acides aminés, nucléotides. Ce mécanisme concerne les sulfamides par exemple.

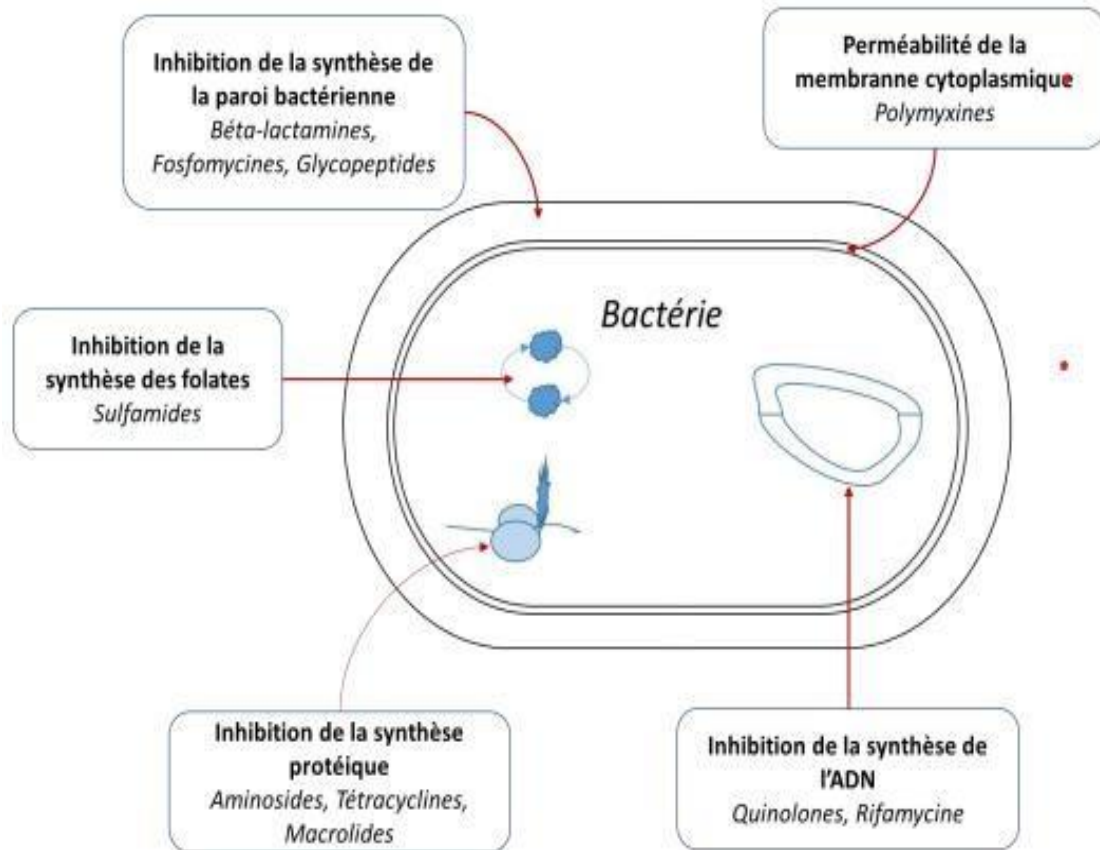


Figure 1: Principaux mécanismes d'action des antibiotiques (Waglechner,2017).

4. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques bloquent de manière spécifique les processus métaboliques vitaux des bactéries sensibles et arrêtent ainsi leur développement, le plus souvent seulement temporairement (effet bactériostatique) mais parfois définitivement (effet bactéricide).

Il existe différents types d'antibiotiques capables d'agir sur les bactéries selon différents mécanismes :

- Antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- Antibiotiques qui altèrent la perméabilité de la membrane plasmique.
- Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique.
- Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs (Meziani, 2012 ; Mammeri, 2013).

5. Mécanisme de résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques possède des supports génétiques et des mécanismes biochimiques (Figure 2).

A. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Il existe de nombreuses enzymes produites par certaines bactéries qui détruisent l'antibiotique par divers mécanismes chimique (hydrolyse, acétylation, phosphorylation ...).

Elle consiste en la production d'une enzyme spécifique qui détruit ou modifie l'antibiotique en donnant des dérivés inactifs sur la bactérie. Le pouvoir antibiotique des bêta-lactamines, des aminosides et des chloramphénicol peut être inactivé par une enzyme comme *B*-lactamase, estérase (Shacoori T. ;2011).

Ce mécanisme est basé sur la destruction d'un antibiotique avant même que celui-ci pénètre la cellule. Il se produit via la sécrétion par la bactérie d'une enzyme capable de détruire des liens chimiques nécessaires à l'intégrité fonctionnelle du médicament. C'est donc une stratégie offensive par laquelle la bactérie inactive l'antibiotique.

Les bêta-Lactamases sont un exemple d'enzymes produites par les bactéries qui inactivent les B-Lactamines telles les pénicillines et les céphalosporines. D'autres catégories d'enzymes inactivent plus précisément les aminosides ou d'autres antibiotiques, incluant le chloramphénicol et la fosfomycine (Véronique f,2003).

• Classe A :

Enzymes caractérisés par la présence d'une sérine dans leur site actif, elles dégradent préférentiellement les pénicillines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique.

• Classe B :

Métallo-enzymes qui ne sont actives qu'en présence de Zn^{2+} .elles sont donc inhibées par des agents chélateurs de cations bivalents. Ces enzymes ont généralement un large spectre d'activité, elles sont impliquées dans la résistance aux carbapenemes.

• Classe C:

Enzymes présentant surtout une activité sur les céphalosporines. Ils ne sont pas inhibés par l'acide clavulanique. C'est la cloxacilline qui permet in vitro d'inhiber leur production par la bactérie, permettant ainsi de les caractériser.

• Classe D:

Ces enzymes agissent principalement sur les pénicillines. Ils sont variablement inhibés par l'acide clavulanique. Leur mise en évidence in vitro est difficile par les tests phénotypiques.

B. Diminution de perméabilité

L'absence de perméabilité de la paroi est un phénomène de résistance naturelle chez certaines espèces mais peut survenir chez des espèces sensibles à la suite d'une mutation chromosomique.

La réduction de la perméabilité cellulaire se produit par diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site, provoquée par une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. Une altération des porines dans la paroi des bactéries à gram négatif peut

Réduire ou bloquer la pénétration de l'antibiotique jusqu'à son site d'action (**Courvalin Pet al.,2006**).

L'altération des purines suite à une mutation chromosomique diminue le passage des molécules et réduit la sensibilité des bactéries à certains antibiotiques (**Shacoori T. ;2011**).

C. Altération (ou modification) des sites de liaison

Les cibles subissent des mutations entraînant l'apparition d'une nouvelle cible non reconnue par l'antibiotique (**Rahal, 2013**).

Phénomène engendré par des chromosomes ou des plasmides, ce mécanisme de résistance produit une baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action, Si la cible d'action d'antibiotique a subi une altération par une mutation, l'antibiotique est incapable de se fixer ou se fixe mal à cette molécule modifiée. Par conséquent son action inhibitrice ou destructrice est limitée ou annulée. Exemple : modification des PLP est l'un des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines (**Courvalin Pet al.,2006**).

D. Efflux actif

Ce sont des protéines qui agissent comme des pompes : insérées dans la membrane cytoplasmique externe, elles expulsent les antibiotiques vers l'extérieur en utilisant l'énergie produite par la membrane cytoplasmique (**Rahal, 2013**).

Le pompage actif de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie empêche l'antibiotique d'atteindre son site d'action. Les transporteurs d'efflux de plusieurs médicaments sont des composants courants des cellules bactériennes et contribuent principalement à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens. Ce sont des pompes qui nécessitent de l'énergie. L'exposition aux antibiotiques entraîne une surexpression par mutation de transporteurs, ce qui augmente la résistance bactérienne. L'exposition à un antibiotique d'une autre classe peut également provoquer une résistance par efflux (**Sylvie C.,2009**).

E. Résistance inductible

Lorsque la concentration de certains antibiotiques dépasse un certain minimum, ils peuvent provoquer une résistance dans une cellule bactérienne. Par exemple, lorsque du chloramphénicol est présent chez des bactéries gram positives, telles que les Staphylocoques, cela provoque la production d'une enzyme appelée chloramphénicol acétyltransférase, qui catalyse l'acétylation, ce qui entraîne l'inactivation de l'antibiotique (**Sylvie C.,2009**).

F. Acquisition d'un déterminant de résistance exogène

Des gènes spécifiant une résistance à un ou à plusieurs antibiotiques peuvent être acquises par transformation, conjugaison, transposition, conjugative ou transduction. Dans certains cas, une <<cassette génétique>> codant pour la résistance aux antibiotiques s'insère par recombinaison

Localisée dans une séquence spécifique de l'ADN (intégron). Un intégron comprend le site d'insertion et aussi l'intégrase (recombinase) requise (Courvalin Pet al.,2006).

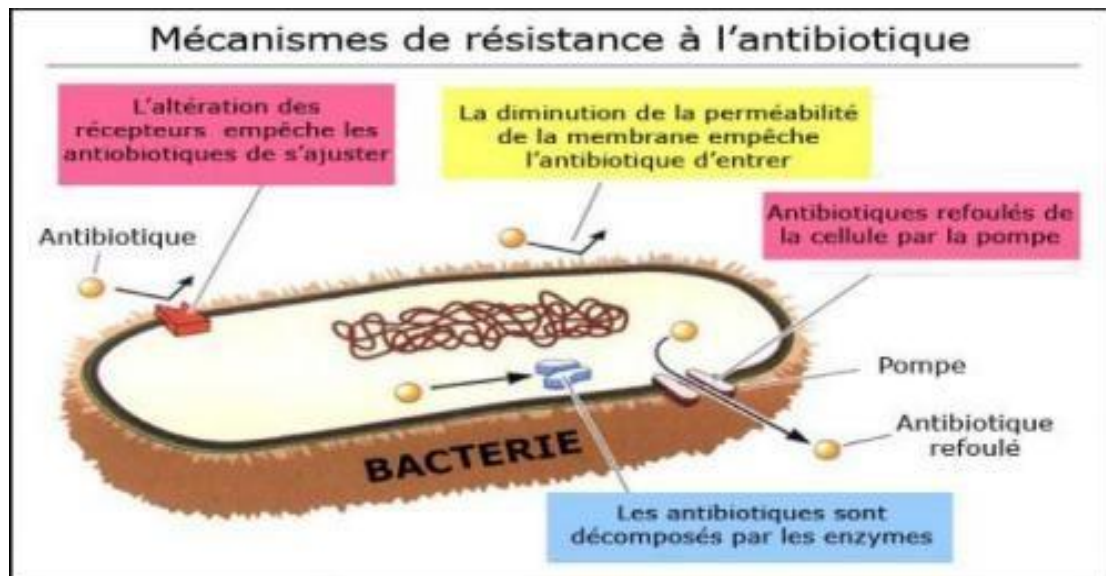


Figure 3: Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux antibiotiques .

En revanche, les souches multirésistantes se sont multipliées. En 2014, 22 % des souches de pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*) sont résistantes aux pénicillines et 24 % sont résistantes aux macrolides. *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*, après avoir développé une résistance à l'amoxicilline, sont devenues résistantes aux céphalosporines de troisième génération. La situation est également préoccupante pour les infections à entérocoques dont les souches multirésistantes provoquent des infections nosocomiales sévères, voire mortelles (HaoH et al.,2012).

Les Bactéries Multi Résistantes aux antibiotiques (BMR) sont des bactéries qui conjuguent plusieurs mécanismes de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques, ce qui limite les possibilités thérapeutiques en cas d'infection (CartwrightE.J.P. et al.,2013).

5. Mécanisme de résistance d'E.coli aux différentes familles d'antibiotiques

Comme toutes les entérobactéries, *E. coli* présente une résistance naturelle aux glycopeptides et à la pénicilline G. Elle fait partie du groupe 1 des entérobactéries qui sont naturellement sensibles aux bêta-lactamines.

A. Les Bétalactamines

Les bêta-lactamines (β -lactamines) ou antibiotiques β -lactame sont une large classe d'antibiotiques qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de la β -lactamase, en bref, tout antibiotique qui contient un noyau β -lactame dans sa structure moléculaire¹ (**Rossi S, 2004**).

Dans le cas des Entérobactéries, la résistance aux β -lactamine est due à une inactivation de l'antibiotique par l'acquisition d'enzyme. Trois principaux types d'enzymes doivent être connus :

A.1 Les pénicillinases

Il s'agit d'un groupe de molécules, ayant en commun le noyau pénème, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau β -lactame. Qui sont plasmatique, elles peuvent être de bas niveau et donc responsables d'une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines, ou de haut niveau et donc responsable d'une résistance non seulement aux trois antibiotiques cités mais aussi aux molécules possédant des inhibiteurs de β -lactamases ainsi qu'aux céphalosporines de première et deuxième génération on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam) (**Zahar et Moumil, 2013**).

Une enzyme dite TRI (TEM Béta lactamases, résistantes aux inhibiteur). Qui hydrolyse non seulement le cycle β -lactames mais aussi l'inhibiteur des β -lactamases et qui sera donc responsable d'une résistance aux aminopénicillines, aux uréidopénicillines aux carboxypénicillines et aux inhibiteurs de β -lactamase (**Zahar et Moumil, 2013**).

A.2 Les céphalosporinase

Les entérobactéries possèdent une céphalosporinase chromosomique. Toutes les Entérobactéries peut acquérir une céphalosporinase plasmatique appelée β les (β -lactamase à spectre étendu) qui est responsable d'une résistance à toutes les β -lactamines à l'exception de l'imipénème (**Zahar et Moumil, 2013**).

On distingue :

-Les céphalosporines de première génération (C1G) : elles sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif. Exemples : céfalotine, céfazoline et céfalexine ;

-Les céphalosporines de deuxième génération (C2G) : elles ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif. Exemples : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan ;

-Les céphalosporines de troisième génération (C3G) : elles ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries. Exemples : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et céfopérazone ;

-Les céphalosporines de quatrième génération (C4G) : elles sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases. Elles restent actives sur les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase. Exemples : céfépime et ceftazidime (Senoussi A. 2015).

E. coli peut acquérir une céphalosporinase plasmidique appelée β les (β lactamase à spectre étendu) qui est responsable d'une résistance à toutes les β lactamines à l'exception de l'imipénème. Toutefois concernant le céfépim et la ceftazidime, une activité de ces deux antibiotiques reste possible mais le microbiologiste dans son interprétation rendra ces deux molécules comme inactives (Senoussi A. 2015).

A.3 Carbapénèmases

Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques naturels ou semi-synthétiques obtenus à partir de *Streptomyces cattleya*. Ils font partie de la famille des bêta-lactamines ; avec un spectre large supérieur à celui des autres enzymes hydrolysant les β -lactamines (Miller AD,2011).

Ils agissent en liant des protéines bactériennes, les penicillin binding proteins (en) (PBP) et plus spécifiquement la PBP-2 et la PBP-3, des bacilles gram négatif. Ces PBP sont des transpeptidases, enzymes de synthèse du peptidoglycane qui est un des constituants de la paroi cellulaire de ces micro-organismes. En inhibant ce mécanisme, on entraîne un défaut de la paroi cellulaire qui provoque ensuite une lyse de la cellule bactérienne (Miller AD,2011).

B. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides rapides, concentration-dépendants, à spectre antibactérien large et recommandés dans de nombreuses indications.

Forment une large classe d'antibactériens de synthèse qui comprennent les dérivés de l'acide nalidixique (Pasternak B,2018).

Tableau 1: Les quinolones.

	Mécanisme d'action	Mécanisme de résistance	Utilisation
Les quinolones	<p>Dans le cas des infections dues à E. coli :</p> <ul style="list-style-type: none"> - sont utilisés à titre curatif. - ils inhibent l'activité ligase des topoisomérases de type II. - libèrent de l'ADN avec des cassures simple et double brin qui conduisent à la mort cellulaire (Huh K, Kang M,2023). 	<p>Deux principaux mécanismes de résistance aux quinolones chez E.coli s'exercent séparément ou en combinaison et confèrent des niveaux de résistance variables.</p> <p>-La résistance par mutation chromosomique qui est due :</p> <p>1)soit à la diminution d'affinité des cibles intracellulaires qui sont les complexes ADN-ADN gyrase et ADN-ADN topoisomérase</p> <p>IV (Huh K, Kang M,2023).</p> <p>2) soit à la diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique, par défaut de Pénétration passive et/ou excrétion active.</p> <p>- la résistance plasmidique.</p>	<p>Les fluoroquinolones sont des quinolones de deuxième génération couramment utilisés pour traiter les infections urinaires et pulmonaires. Ces antibiotiques comprennent :</p> <p>Ciprofloxacin, Gemfloxacin, Norfloxacin.</p>

C. Les aminosides

Les aminosides ou aminoglycosides constituent une famille d'antibiotiques actifs sur certains types de bactéries. Ils comprennent l'amikacine, l'isépamicine, la gentamicine, la kanamycine, la néomycine (dont la néomycine B ou framycétine), la nétilmicine, la paromomycine, la streptomycine (le plus connu) (**Tao Yang,2020**).

Ce sont des antibiotiques précieux en raison de leur spectre d'action et de leur efficacité.

La plupart de ces antibiotiques sont produits par des bactéries de la famille des actinomycètes, ou en sont dérivés par hémisynthèse. Ceux qui sont dérivés des actinomycètes du genre Streptomyces prennent le suffixe -mycine, ceux qui sont dérivés du genre Micromonospora prennent le suffixe -micine **Bennani M. (2014)**.

Leur utilisation est freinée par leur absence d'activité par voie orale ce qui explique pourquoi les prescripteurs préfèrent des antibiotiques plus maniabiles.

Il existe trois enzymes de résistance, chacune d'entre elles conférant un phénotype de résistance spécifique aux aminosides. Ces enzymes (acétyltransférase, nucléotidyl-tracférase et phosphotransférases) sont codées par des gènes plasmidiques ou transposable.

Tableau 2: Les aminosides.

	Mécanisme d'action	Mécanisme de résistance	Utilisation
Les aminosides	<p>Les aminosides exercent leur action par l'inhibition de la synthèse protéique bactérienne en se fixant sur la sous-unité 30s du ribosome bactérien.</p> <p>Les bactéries strictement anaérobies sont résistantes naturellement aux aminosides, pour la Résistance acquise elle est en nette augmentation. (Vidal L,2007)</p>	<p>-Altération de la cible : le mode d'action des aminosides laisse présager la mutation de l'ARN 16S comme moyen de résistance. Trois activités de méthylation de l'ARN 16S modifient le site A aux positions G1405 (N7), A1408 et C1407 (N5).</p> <p>-Modification enzymatique de l'antibiotique.</p> <p>-Piégeage de l'antibiotique.</p> <p>-Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique.</p> <p>Les aminosides pénètrent la membrane externe d'E.coli par les porines. Le passage par la voie lipophile</p>	<p>Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides utilisables en première intention par voie parentérale dans les infections sévères à germes Gram négatif Aérobie (Tao Yang,2020)..</p>

D. La fosfomycine

La fosfomycine (fosfonomycine, phosphomycine ou MK-955) est un antibiotique à large spectre produit par certaines espèces de *Streptomyces*.

Produit par différentes espèces de bactéries du genre *Streptomyces* mais aussi par *Pseudomonas syringae* (Roberta Maria Antonello,2020).

En raison de la perte des systèmes de transport nécessaires à l'absorption, *E. coli* présente une résistance à la fosfomycine à des fréquences élevées in vitro. Le système de perméabilité GlpT, dont le substrat principal est l' α -glycérophosphate, et le système UhpT, lorsqu'il est induit par G-6-P, peuvent aider *E. coli* à absorber la fosfomycine. L'AMPc régule positivement ces deux systèmes, et des mutations dans les gènes *ptsI* ou *cyaA* peuvent abaisser les niveaux d'AMPc. (Navas J,2016).

Tableau 3: Les fosfomycines

	Mécanisme d'action	Mécanisme de résistance	Utilisation
Les fosfomycines	<p>La fosfomycine inhibe la synthèse de la paroi bactérienne par action sur la pyruvyl transférase, impliquée dans l'une des premières réactions de la synthèse du peptidoglycane. Cette étape étant intracytoplasmique, la pénétration de la fosfomycine à l'intérieur de la bactérie est nécessaire à son activité. (Roberta Maria Antonello,2020).</p>	<p>La résistance à la fosfomycine peut résulter soit de mutation(s) chromosomique(s), soit, plus rarement, être médiée par un gène plasmidique. Différents mécanismes de résistance ont été décrits jusqu'à ce jour. Le premier mécanisme de résistance, le plus fréquent, consiste en une diminution de la perméabilité à la fosfomycine par des mutations chromosomiques altérant les systèmes de transport de la fosfomycine, soit par mutation directe du gène codant pour les transporteurs (<i>glpT</i> et/ou <i>uhpT</i>) (Roberta Maria Antonello,2020).</p>	<p>Est recommandée pour traiter les infections des voies urinaires, en particulier celles causées par <i>E. coli</i>, et elle est généralement administrée en une seule dose.</p>

E. Rifamycine

La rifampicine est un antibiotique de la famille des rifamycines utilisé pour traiter un certain nombre d'infections bactériennes dont la tuberculose, la lèpre et la légionellose en combinaison avec d'autres antibiotiques (Elizabeth A,2001).

Tableau 4: Les rifamycines

	Mécanisme d'action	Mécanisme de résistance	Utilisation
Les fosfomycines	Ces molécules se lient à la sous-unité β de l'ARN polymérase-ADN dépendante et bloquent l'initiation de la transcription de l'ADN bactérien en ARN Messager.	Des mutations sur le gène rpoB qui code la sous-unité β de l'ARN polymérase-ADN dépendante entraînent le mécanisme de résistance. Ces mutations altèrent la structure de l'ARN polymérase sur laquelle l'antibiotique ne pourra plus agir	Elle possède un large spectre antibactérien qui comprend les staphylocoques, les streptocoques et les mycobactéries.

6. Généralités sur Escherichia coli

Escherichia coli est l'agent le plus fréquent parmi les isolats cliniques provoquant une infection chez l'homme. Certaines souches d'Escherichia coli se caractérisent par leur résistance aux plusieurs antibiotiques ce qu'on appelle la multirésistance. La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue aujourd'hui un problème majeur de la santé publique. La situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier (**Liazid A,2012**).

6.1 Historique découvert et taxonomie

E.coli est une bactérie appartenant à la classe des γ -protéobactéries et à la famille des Enterobacteriaceae. Elle fut décrite pour la première fois en 1885 par le pédiatre allemand Théodore Escherich (1857-1911) dans les entérites des nourrissons (**A. Pantel,2016**). Dénommée « Bacteriumcoli commune », « Bacillus coli » ou encore « Bacterium coli », Castellani et Chalmers proposèrent en 1919 de renommer cette bactérie Escherichia coli en hommage aux travaux d'Escherich. Cette dénomination fut officiellement adoptée en 1958.

E. coli est une bactérie établie dans le tube digestif des humains et des animaux à sang chaud. La plupart des souches d'E. coli sont inoffensives et seules quelques-unes sont pathogènes et entraînant alors des Gastroentérites, Infection Urinaire, Méningites ou Septicémie (**Kaper et al., 2004**).

La plupart des souches sont inoffensives, voire bénéfiques pour l'être humain, produisant de la vitamine K ou empêchant la colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes, établissant alors une relation de type mutualiste (**Bentley et al.,1982**).

E. coli est l'espèce type du genre Escherichia. Les études d'hybridation ADN/ADN ont conduit à individualiser cinq autres espèces au sein de ce genre : E. *hermannii*, E. *vulneris*, E. *fergusonii*, E. *Alberti* et, décrite très récemment, E. *marmotae* (130–134). Ces espèces sont isolées de manière anecdotique en pathologie humaine et possèdent des caractères biochimiques propres permettant de les différencier les unes des autres (**Liazid A,2012**).

6.2 Habitat

E. coli est un hôte normal du tube digestif de l'Homme. L'appellation commune "coli bacille" est une contraction de « bacille du côlon » rappelant son caractère de bactérie commensale du tube digestif. Chez l'Homme, elle constitue l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie. Chaque personne porte dans son tractus intestinale une population d'E.coli (**Marion Gardette, 2019**).

C'est l'espèce dominante de la microflore aérobie du tube digestif. E. coli ou colibacille est habituellement une bactérie commensale, elle colonise de manière asymptomatique le tractus digestif de l'Homme dans les premières heures qui suivent la naissance et constitue dès lors

L'espèce bactérienne dominante de la flore anaérobie facultative du colon humain. Le tractus digestif constitue son habitat primaire. La bactérie *E. coli* est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations supérieures à 10⁶ UFC/g de contenu intestinal. Elle demeure très souvent dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif qui constitue une niche écologique favorable pour son développement de par ses conditions de température, d'humidité et de disponibilité en nutriment (Chalmers et al., 2000). La bactérie *E. coli* est rejetée dans l'environnement à travers les fèces à une concentration d'environ 10⁸ UFC/g de fèces. Elle se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages (Abraham, 2018).

Cette bactérie est également présente au niveau du revêtement cutanéomuqueux, à proximité des orifices naturels (Ari R et al., 2008).

Le tableau suivant représente la classification d'*E. coli* (Achi Sarah, 2018).

Tableau 5: La classification d'*E. coli* selon le Bergeys manual 2012

Règne	Bacteria
Embranchement	<i>Protobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Protobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

6.3 Classification des *E. coli* responsables des troubles intestinaux

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 (Coimbra et al., 2000) :

- **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., 1973**), 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 (**Benz et Schmidt, 1992 ; Cookson et Nataro, 1996**).

- **Les E. coli Entero-hémorragiques (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 Thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (**Riley et al., 1983**).

6.4 Caractères bactériologiques

6.4.1 Caractères bactériologiques et culturels

Bacille à Gram négative, généralement non capsulé, non sporulé, mobile, aérobie anaérobie facultatives, bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mesurent 2 µm à 4µm de longueur sur 0.4 à 0.6 µm de largeur, non exigeante et facile au milieu ordinaire, lactose positive sur le milieu Mac Conkey (**Nguyen et al., 2000**) (**Figure 4**).

Elle se développe en 24 heures à 37 °C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées Sur gélose au sang. Les colonies de E. coli sont lisses, gris terne, et de 2 à 3 mm de diamètre. Sur milieu Mac Conkey, Les colonies d'E coli Lactose-positives, sont de couleur rose à rouge, plates, sèches et de 2 à 3 mm de diamètre, elles sont généralement entourées d'une zone rose plus foncée des sels biliaires

Précipités. Les colonies E. coli Lactose-négatives produisent des colonies incolores sur Mac qui sont de 2 à 3 mm de diamètre (**Haouzi R.,2013**). Milieu différentiel permettant d'orienter l'identification des Enterobacteriaceae fermentant ou pas le lactose. Son utilisation est recommandée pour la recherche d'Escherichia coli dans l'eau, les aliments, les produits laitiers et les préparations pharmaceutiques.

- Stockage 8 - 15 °C
- Incubation : 30 - 35 °C pendant 18 - 72 h

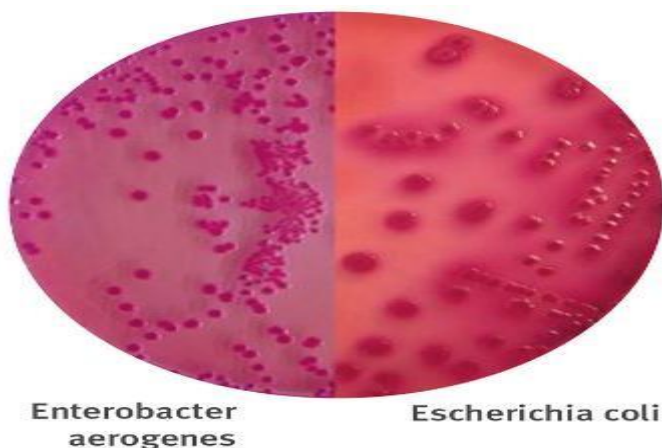







Figure 5: Escherichia coli sur milieu de Mac Conkey

Tableau 6: Caractère culturaux d'E.COLI sur les milieux (Minh-DuyPhan,2022).

<p>1. Sur gélose nutritive</p>	<p>Apparue sous forme de colonies arrondies, humides, brillantes et de couleur blanchâtre ou légèrement jaunâtre lisse (S) ou rugueuse (R) ou parfois muqueuses.</p>	 <p>Aspect d'E.coli sur gélose nutritive (Moodle.umontpellier.fr).</p>
<p>2. Sur milieu EMB</p>	<p>(Bleu de méthylène éosine) elle donne des colonies d'un violet foncé avec éclat métallique verdâtre.</p>	<p>Aspect d'E.coli sur milieu</p>

		 <p align="center">EMB(ResearchGate)</p>
<p>3. Sur milieu Hektoen</p>	<p>La gélose Hektöen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes</p>	<p>Escherichia coli sur Hektoen</p>  <p>Aspect d'E.coli sur milieu Hektoen</p>
<p>4. Sur gélose au sang</p>	<p>Colonies rondes, translucides parfois hémolytiques</p>	 <p>Aspect d'E'coli sur gélose au sang</p>
<p>5. Sur Mac Conkey</p>	<p>Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur.</p>	 <p>Aspect d'E. coli sur milieu Marc Conkey(shutterstock.com)</p>

1) Caractères morphologiques

Il s'agit d'un bacille Gram négatif, en forme de bâtonnet, asporulé, qui peut se déplacer au moyen de flagelles péritriches ou être non mobile. Les bactéries se développent sur gélose MacConkey (les colonies, rouges ou incolores, atteignent un diamètre de 2 à 3 mm). Elles peuvent croître dans des conditions aérobies ou anaérobies, et produisent deux types d'entérotoxines : des entérotoxines thermolabiles (LT) (oligomériques) et des entérotoxines thermostables (ST) (monomériques) (Wilson, W. R et al.,2001). Elle est généralement mobile grâce à une ciliature péritriche mais cette mobilité est très variable selon le milieu où la souche a été ensemencée. La figure 2 représente une observation microscopique de coloration de Gram d'Escherichia coli (Figure 6)

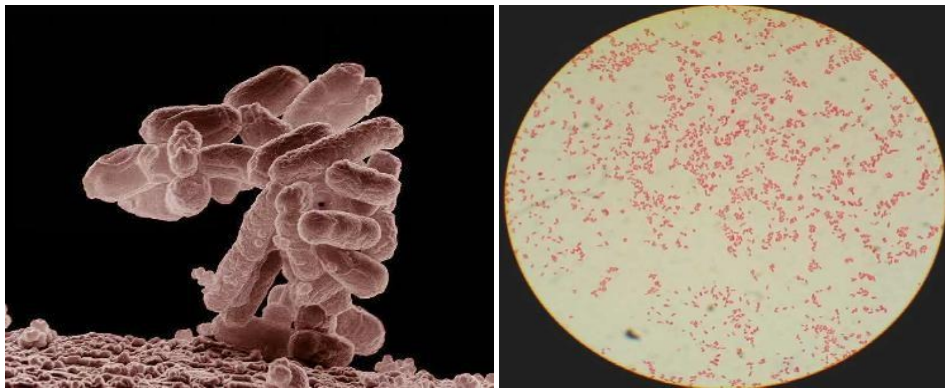


Figure 7: E.Coli sous microscope électronique et après coloration de Gram

2) Caractères biochimiques

Cette bactérie possède également des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines.

E. coli fermente le glucose avec production de gaz, le lactose, le mannitol, le sorbitol. E. coli produit de l'indole, il possède une β -galactosidase. Il ne possède ni uréase, ni TDA, ni gélatinase. Il ne fermente ni l'adonitol, ni l'inositol. Il ne produit ni H₂S, ni acétoïne. Il n'utilise pas le citrate de Simmons. Il existe un certain nombre de souches d'E. coli qui possèdent une LDC, une ODC et une ADH (Nguyen et al.,2000).

Tableau 7 : Caractères biochimiques d'E.coli et les principales caractéristiques d'Escherichia coli (Nguyen et al.,2000).

Caractéristiques	<i>Escherichia coli</i>
ONPG	+
Oxydase	-
Rouge de méthyle	+
Voges-Proskauer	-
Production d'indole	+ (généralement présent)
Utilisation du citrate	-
Production de H ₂ S	-
Uréase	-
β-galactosidase	+ (généralement présent)
Gaz à partir de glucose	+
Acide à partir de lactose	+
Phénylalanine désaminase	-
Lysine décarboxylase	+ (généralement présent)
Ornithine décarboxylase	+ (généralement présent)
Mobilité	Péritriches si mobiles
Liquéfaction de la gélatine (22°C)	-
% de GC	48-59

+ : caractères positifs

- : caractères négatifs

3) Caractères antigéniques

a) Antigènes O

Les antigènes O (lipopolysaccharidiques) sont très nombreux. 164 groupes O sont connus chez E. coli.

b) Antigènes protéiques

Ils sont constitués de pili ou fimbriae.

- Les pili communs (dits de type I ou FI) codés par un gène chromosomique.

a) Antigène M

Il n'existe que chez les souches d'E. coli cultivant sous forme de colonie mucoïde. Il est constitué d'acide cholanique.

b) Antigènes H

56 Antigènes H différents sont connus.

c) Antigène B

D'enveloppe ou de surface, thermolabile. Ces travaux ont permis de préciser que le pouvoir pathogène d'une souche d'Escherichia coli dépend en partie de sa structure antigénique.

d) L'antigène K : qui groupe trois variétés d'antigène de surface.

e) L'antigène L : d'enveloppe thermolabile, qui possède une activité hémolytique et névrotique.

4) Pouvoir pathogène

E. coli peuvent se transformer en bactéries pathogènes et provoquent plusieurs types d'infections mais aussi des gastro-entérites graves et mortelles en cas de manqué de traitement. Ils existent deux types d'*E. coli* pathogènes : soit d'origine extra-intestinales : urinaire, abdominale, méningées néo-natal et septicémies Ou soit d'origine intestinales (diarrhéiques) ou Entérique : responsables de gastro-entérites infantiles ou des diarrhées des voyageurs (**Cohen et al., 2012**).

5) Pathologies associées aux EHEC

Les STEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou purpura thrombotique Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (**Tarr, 1995**).

a) La colite hémorragique

La colite hémorragique constitue la principale manifestation clinique de l'infection à *E. coli* O157:H7 (**Griffin et Tauxe, 1991; Tarr, 1995**). Elle se définit par des crampes abdominales, une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante (**Griffin et Tauxe, 1991**). La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués (**Tarr, 1995**). Des nausées, des vomissements, des céphalées et des frissons ont également été rapportés, mais leur fréquence est plus faible. La période d'incubation de 2 à 10 jours, est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses (**Griffin et Tauxe, 1991 ; Sharp et al., 1994**). L'évolution est généralement spontanément favorable (90% des cas) en quelques jours.

Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la suppression des apports alimentaires et De la mise en route d'une nutrition parentérale jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé 32 Du patient (**Su et Brandt, 1995**). A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour Controversée.

b) Le SHU (Syndrome Hémolytique et Urémique)

Le SHU est un trouble rare, dans lequel de nombreux minuscules caillots sanguins (thrombi) se forment soudainement dans tout le corps. Le terme « *hémolytique* » signifie que les globules rouges sont dégradés et le terme « *urémique* » signifie que les lésions rénales provoquent l'accumulation d'urée (un déchet) dans le sang. Le SHU est apparenté au purpura thrombocytopénique thrombotique (PTT), mais il survient plus souvent chez les enfants et provoque plus souvent une insuffisance rénale, alors que le PTT est plus fréquent chez les adultes.

Deux à 7 % des patients atteints d'une infection intestinale à *E. coli* O157:H7 développent un SHU. Cette incidence est supérieure chez l'enfant et les personnes âgées : 10 % chez les enfants de moins de 10 ans et 10 à 20 % chez les sujets âgés (**Griffin et Tauxe, 1991**).

Le SHU typique, ou SHU post-diarrhée, représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et représente la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Le pronostic rénal est favorable dans environ les 2/3 des cas (**Loirat et al., 1992**). Il correspond à des lésions de microangiopathie thrombotique glomérulaire ou de nécrose corticale. Il est caractérisé par une triade de symptômes associant une anémie hémolytique avec schizocytose, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë (**Fong et al., 1982**).

c) Le PTT (**Purpura Thrombotique Thrombocytopénique**)

Le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925. Comme pour le SHU, l'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, auto-immune...), et la relation entre l'infection par *E. coli* O157:H7 et l'apparition de ce syndrome est récente (**Kovacs et al., 1990**).

Le PTT touche essentiellement l'adulte. C'est un syndrome caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë. La diarrhée prodromique est généralement absente (**Hofmann, 1993**).

La durée du PTT est habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais il peut parfois se prolonger pendant des mois. Quand la maladie progresse, elle peut toucher le système nerveux central et les reins, et leur atteinte est, dans la plupart des cas, la cause principale de la mort. Des signes neurologiques sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale. Il s'agit initialement de modifications du comportement avec confusion, délire et troubles de conscience. Les signes d'atteinte focale associent crises d'épilepsie, hémiparésie, aphasie et anomalies du champ visuel. Ces symptômes neurologiques peuvent fluctuer et se terminer en coma. L'atteinte des vaisseaux myocardiques peut être à l'origine de mort subite chez certains malades.

Le traitement s'est progressivement focalisé sur l'utilisation d'exsanguinotransfusions ou de plasmaphèreses répétées associées à la perfusion de plasma frais congelé. Avec cette approche thérapeutique, la mortalité globale a nettement diminué, l'évolution est favorable dans plus de la moitié des cas.

- **Les infections**

Escherichia coli peut provoquer plusieurs infections :

-Infection urinaire

-Infection intestinale

6) Facteurs de Pathogénicité

Il existe différents facteurs de pathogénicité chez Escherichia coli :

I. Capsule

Elle est de nature polysaccharidique. On en connaît 80 variétés immunologiques différentes (antigènes K). La capsule rend la phagocytose plus difficile et inhibe l'action du complément. La capsule de type K1 est peu immunogène (elle a la même structure que la capsule de méningocoque du groupe B). Ce sont les E. coli de type K1 qui sont responsables de la majorité des infections néonatales (Nauciel C., Vildé J.L,2007).

II. Les adhésines

De multiples adhésines ont été décrites. Elles peuvent induire une adhésion à des globules rouges ou à des cellules épithéliales en culture. L'aspect que revêt l'interaction avec les cellules épithéliales peut donner une indication sur le type d'adhésine en cause. La plupart des adhésines se présentent sous forme de fimbriae.

Les facteurs d'adhésion semblent être des éléments majeurs de la pathogénicité. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des fimbriae, des protéines de membrane externe et des lipopolysaccharides. De nombreuses études *in vitro*²⁹ et *in vivo* ont été réalisées afin de connaître les différents facteurs responsables de ce processus (Paton *et al.*, 1997).

III. Toxines

Certaines souches peuvent produire une hémolysine, une enterotoxine thermolabile (LT) ou thermostable (ST) ou bien une toxine analogue à la toxine de *Shigella dysenteriae*, la Shiga-like toxine (SLT ou Stx) (Nauciel C., Vildé J.L,2007).

7. Epidémiologie humaine

Les personnes les plus susceptibles de développer la maladie sont : les enfants en bas âge (< 5 ans), les personnes âgées (> 65ans) et les personnes ayant pris récemment un traitement antibiotique (Griffin et al., 1990). Néanmoins, toute personne est potentiellement à risque et peut développer une diarrhée,

Plusieurs épidémies liées à STEC ont été reliées à la consommation de denrées animales ou d'origine animale et végétale. La viande de bœuf, le lait et les produits laitiers, les jus de fruits ainsi que les légumes crus font partie des aliments actuellement majoritairement incriminés (Mechie et al., 1997).

a. Les modes de transmission

Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination des STEC. (Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

- Transmission alimentaire
- Transmission hydrique
- Transmission inter-humaine
- Contact avec les animaux de ferme et leur environnement (Figure 5).

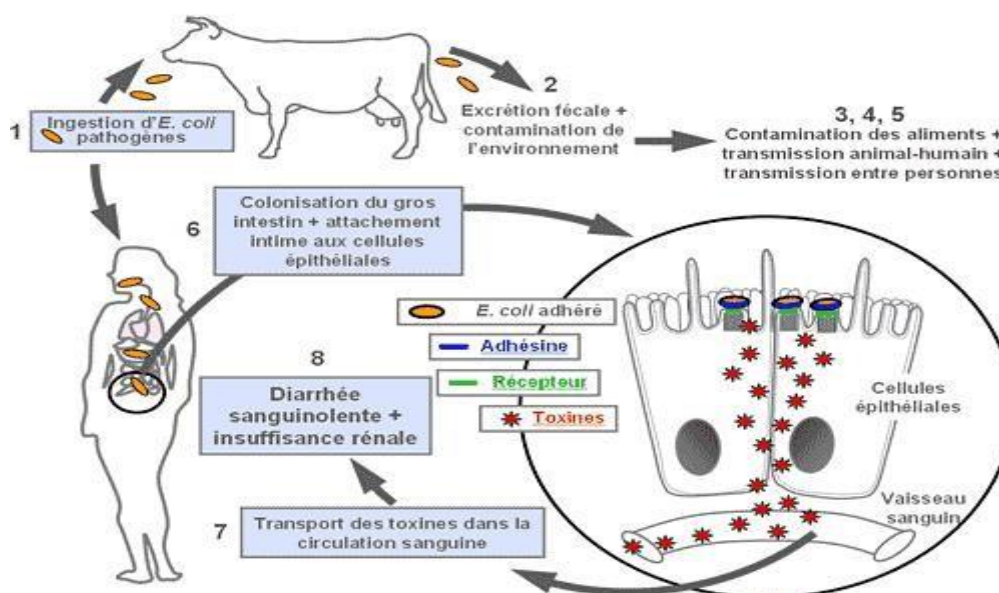


Figure 8: Les modes de transmissions de la bactérie E. coli.

7.1 Les infections urinaires (IU)

Les infections urinaires (IU) sont des pathologies fréquentes en pratique de ville qu'en pratique hospitalière, elles représentent le deuxième site d'infection bactérienne après les infections pulmonaires (SINGLETON, P.,2004). Elles sont définies par la présence d'un nombre significatif de bactéries dans les urines et se manifestent au niveau de l'arbre urinaires (muqueuse des voies urinaires ou parenchyme rénal), l'infection urinaire est toujours accompagnée d'une leucocyturie. Les germes responsables sont le plus souvent de la famille des entérobactéries avec une prédominance de l'espèce *Escherichia coli* qui est responsable de (90%) des IU.

Maladies causées par *E. coli* :

- Infection urinaire (la plus fréquente)
- Infection entérique (certaines souches)
- Infection invasive (rare, sauf chez les nouveau-nés)
- Infection à d'autres sites

Le plus souvent, *E. coli* peut provoquer une infection urinaire, qui consiste habituellement en une infection ascendante (c'est-à-dire, du périnée via l'urètre). *E. coli* peut provoquer une prostatite et une maladie pelvienne inflammatoire.

Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent provoquer des infections dans différentes parties du corps (Larry M. Bush.,2024).

1. **Infection urinaire (cystite)** : L'infection urinaire la plus fréquente due à *E. coli* est la **cystite**. Elle se produit généralement lorsque la bactérie remonte de l'urètre vers la vessie. Les symptômes courants de la cystite comprennent une miction douloureuse, une sensation de brûlure et une envie fréquente d'uriner.
2. **Infection du tractus urinaire (pyélonéphrite)** : Lorsque l'infection atteint les reins, on parle de **pyélonéphrite**. Cette condition peut être plus grave et entraîner de la fièvre, des douleurs lombaires et des frissons. Il est essentiel de traiter rapidement la pyélonéphrite pour éviter des complications.
3. **Autres infections** : En plus des infections urinaires, *E. coli* peut également provoquer d'autres types d'infections, notamment des infections intestinales, des infections invasives (rare, sauf chez les nouveau-nés) et des infections à d'autres sites (par exemple, hépatobiliaires, péritonéales, cutanées et pulmonaires).

Chapitre I

Le gène RPSL

Le gène *RPSL* (ribosomal protein S12) est un gène de résistance aux antibiotiques. Il code pour une protéine ribosomale essentielle dans la synthèse des protéines. Chez *Escherichia coli*, une mutation spécifique dans le gène *RPSL* peut conférer une résistance à certains antibiotiques, tels que la

streptomycine.

8. Le gène *RPSL*

Dans *Escherichia coli*, le gène *RPSL* code pour la protéine ribosomale S12 de la sous-unité 30S. Les mutations dans *RPSL* confèrent une résistance aux antibiotiques à *E. coli* et à d'autres bactéries, *rpsL* notamment *Streptococcus pneumoniae*, *Thermus thermophilus*, *Staphylococcus aureus*, et d'autres encore (**Emilio BG et al.,2007**). Cependant, la souche mutante *RPSL* résistante à la streptomycine devient sensible à la streptomycine lorsque le *RPSL* de type sauvage est exprimé en trans, ce qui indique que le phénotype de sensibilité aux antibiotiques est dominant (**Chen J et al.,2015**). De plus, la croissance des souches merodiploïdes *RPSL* en présence de streptomycine peut être utilisée pour sélectionner la perte de *RPSL* de type sauvage, démontrant ainsi l'utilité de ce gène comme marqueur contre sélectionnable. Ce phénomène souligne l'importance de *RPSL* dans la sensibilité aux antibiotiques et ses applications potentielles dans les techniques de manipulation génétique (**Li N et al.,2015**).

La position exacte du gène sur le chromosome d'*Escherichia coli* peut varier légèrement selon les souches spécifiques de la bactérie, mais en général, il se trouve dans la région du chromosome appelée le locus *RPSL*. Chez *E. coli* K-12 (**Grozdánov et al., 2004**).

8.1 Génome de la souche *E. coli* K12 MG1655

Le génome de la souche commensale non pathogène K12 MG1655 a été publié en 1997 (**Blattner et al., 1997**). Il correspond à un unique chromosome circulaire de 4639221 pb, sur lequel sont identifiés 4289 gènes codant des protéines, 86 gènes codant des ARNt et 22 gènes codant des ARNr rassemblés dans sept opérons ribosomiaux (**Figure 6**).

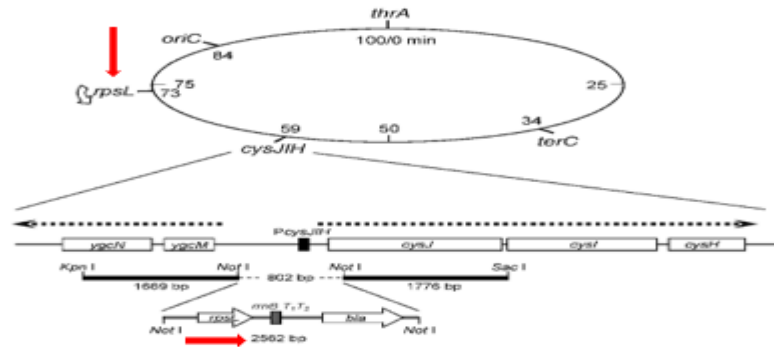
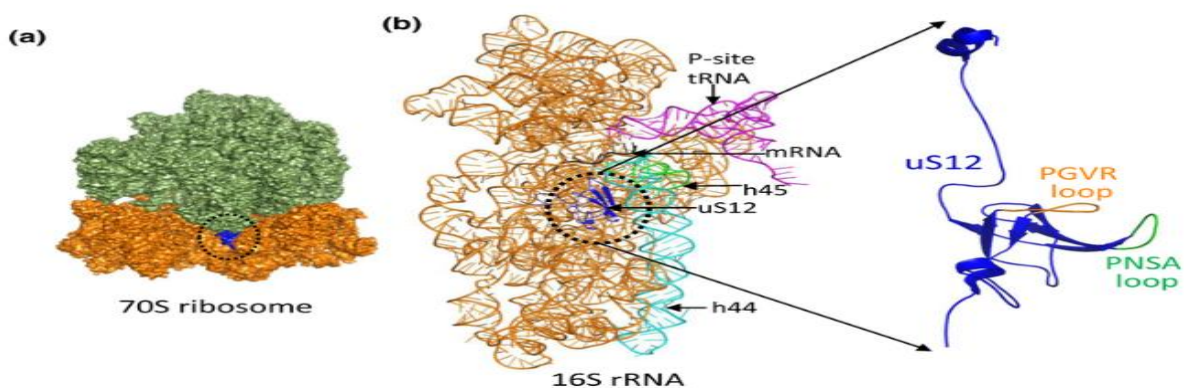


Figure 9:L'intégration d'un transgène rpsL dans le chromosome d'*Escherichia coli*.

1. L'intégration d'un transgène rpsL dans le chromosome d'*Escherichia coli*

Des mutations sensibles à la température (ts) ont été isolées dans un gène de protéine ribosomale (*RPSL*) d'*Escherichia coli* K12. Les mutations ont été cartographiées par complémentation en utilisant divers phages transducteurs et des plasmides portant le gène rpsL, ayant soit un promoteur normal soit un promoteur défectueux pour l'opéron *RPSL* **Bachmann BJ (1983)**. Une de ces mutations, ts118, a résulté en une protéine S12 mutante qui se comportait différemment de la protéine S12 de type sauvage lors de la chromatographie sur colonne de cellulose CM. Des supprimeurs de ces mutations ts ont été isolés et caractérisés (**Guthrie C et al.,1969**); l'un d'entre eux s'est avéré être une mutation d'un gène de protéine non ribosomale étroitement lié au gène de l'ARNase III sur le chromosome d'*E. coli*. Ce supprimeur, qui était récessif par rapport à son allèle sauvage, a été cloné dans un phage transducteur et cartographié finement. Une série de mutations sensibles au froid, affectant l'assemblage des ribosomes à 20°C, a été isolée dans la région purL à nadB du chromosome d'*E. coli* et un groupe, nommé rbaA, a été cartographié au même locus que la mutation suppressive, montrant un lien étroit avec le gène de l'ARNase III (**Figure 7**).



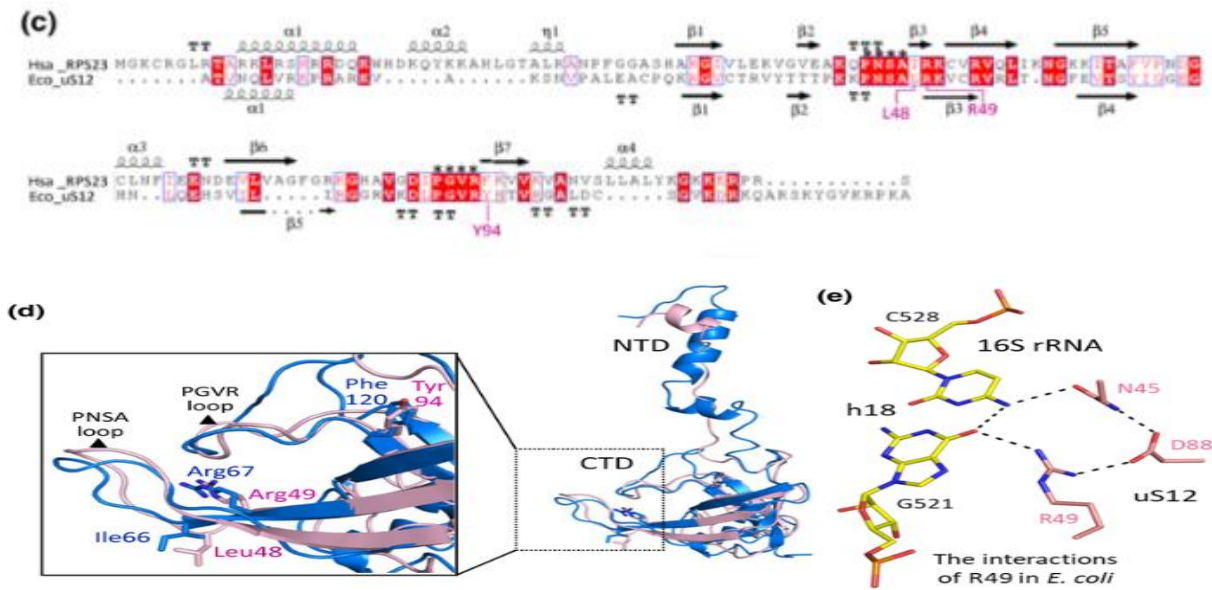


Figure7 : Représente l'intégration d'un transgène rpsL dans le chromosome d'*E.coli*.

2. Structure

La protéine ribosomale uS12 est située à l'interface des sous-unités ribosomales grande et petite, où elle joue un rôle important dans les interactions à la fois avec les ARNt et les sous-unités ribosomales (Cukras AR et al.,2003). uS12 est essentielle pour le maintien d'un état de pré-translocation et, en collaboration avec uS13, elle agit comme un élément de contrôle pour les mouvements de translocation induits par l'ARNr et l'ARNt. Des antibiotiques tels que la streptomycine se lient à uS12 et provoquent une lecture incorrecte du code génétique par le ribosome (Ramakrishnan V et al.,2001).

Récemment, une mutation spontanée hétérozygote dans uS12 humain (correspondant à la mutation R49K juste en aval de la boucle PNSA44-47 conservée universellement dans uS12 d'*Escherichia coli*) a été identifiée comme étant responsable d'une ribosomopathie, mettant en évidence l'importance de la boucle PNSA. Pour étudier les effets d'une mutation similaire en l'absence de tout allèle de type sauvage, nous avons muté le gène *RPSL* (codant pour uS12) chez *E. coli* (Figure 8).

Une mutation courante dans le gène rpsL est la mutation D614G, qui est présente dans les quatre variants du SARS-CoV-2 (alpha, bêta, gamma et delta) et pourrait avoir un impact sur leur phénotype (Chandra Sanyal S et al.,2000).

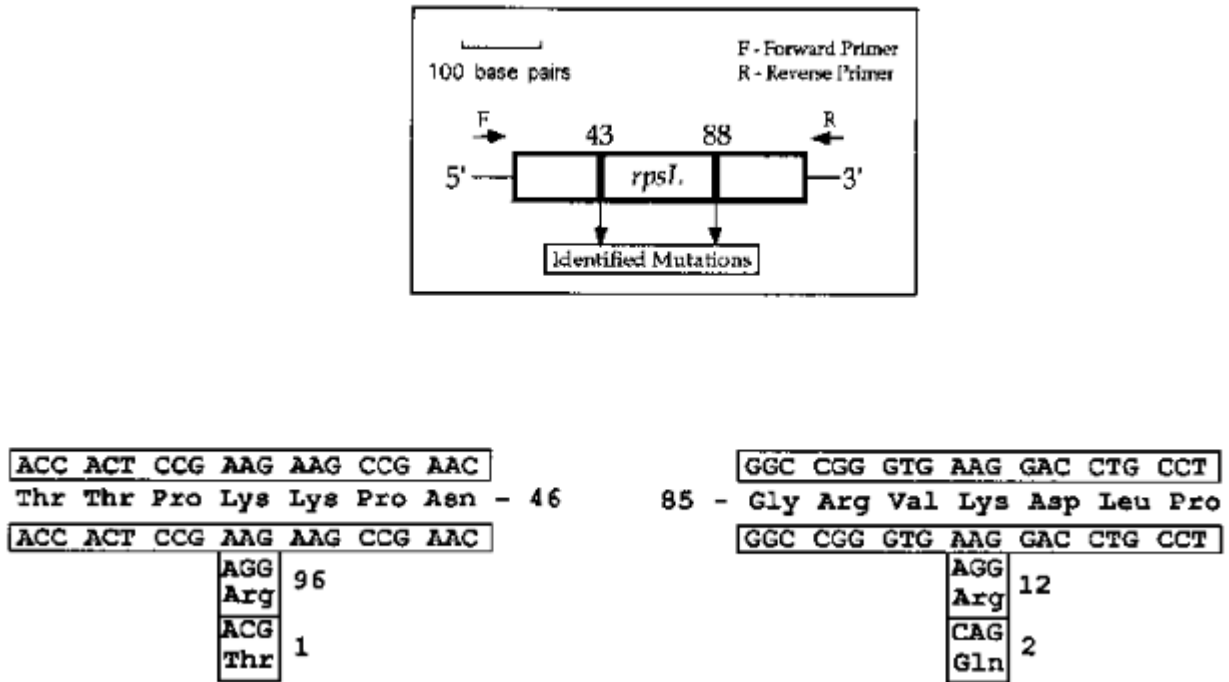


Figure 8: Une représentation schématique des mutations situées dans le gène (*RPSL*) codant pour la protéine ribosomale S12 associée à la résistance à la streptomycine chez *E. Coli* (*Comas I et al.,2011*)

Les souches résistantes à la streptomycine présentent des mutations faux-sens dans les codons 43 et 88 du gène *rpsL* de 372 paires de bases, qui ne sont pas retrouvées chez les organismes sensibles à la streptomycine (*Comas I et al.,2011*). En haut, vous pouvez voir une représentation schématique du gène *RPSL* et les positions des sites d'amorces Oligo nucléotidiques utilisés pour l'amplification du gène en vue d'un séquençage automatisé, comme décrit dans la référence 77. En bas, les mutations faux-sens dans les codons 43 et 88 identifiées par plusieurs chercheurs (41, 58, 64, 77, 106, 109, 112) sont affichées. Les numéros situés à droite des codons variant sont une compilation de l'occurrence de chaque mutation, comme décrit dans les références 41, 58, 64, 77, 106 et 109. Ne sont pas affichés un changement CGC3CAC (Arg3His) situé dans le codon 9 et une altération GTG3ATG (Val3Met) dans le codon 93, chacun retrouvé dans une souche de *E.coli* résistante à la streptomycine (109) (*Björkman J et l.,2000*).

La technique de PCR

8.2 La PCR (Polymerase Chain Reaction)

En 1983, Kary Mullis met au point une technique d'amplification de l'ADN: la PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne). Aujourd'hui c'est une technique incontournable et couramment utilisée en routine dans les laboratoires. La PCR, Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne, est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN. Elle permet ainsi d'obtenir plusieurs centaines de microgrammes d'ADN à partir de moins de 1 pictogramme d'un gène, soit une amplification de l'ordre du milliard (Deluzarche, 2019).

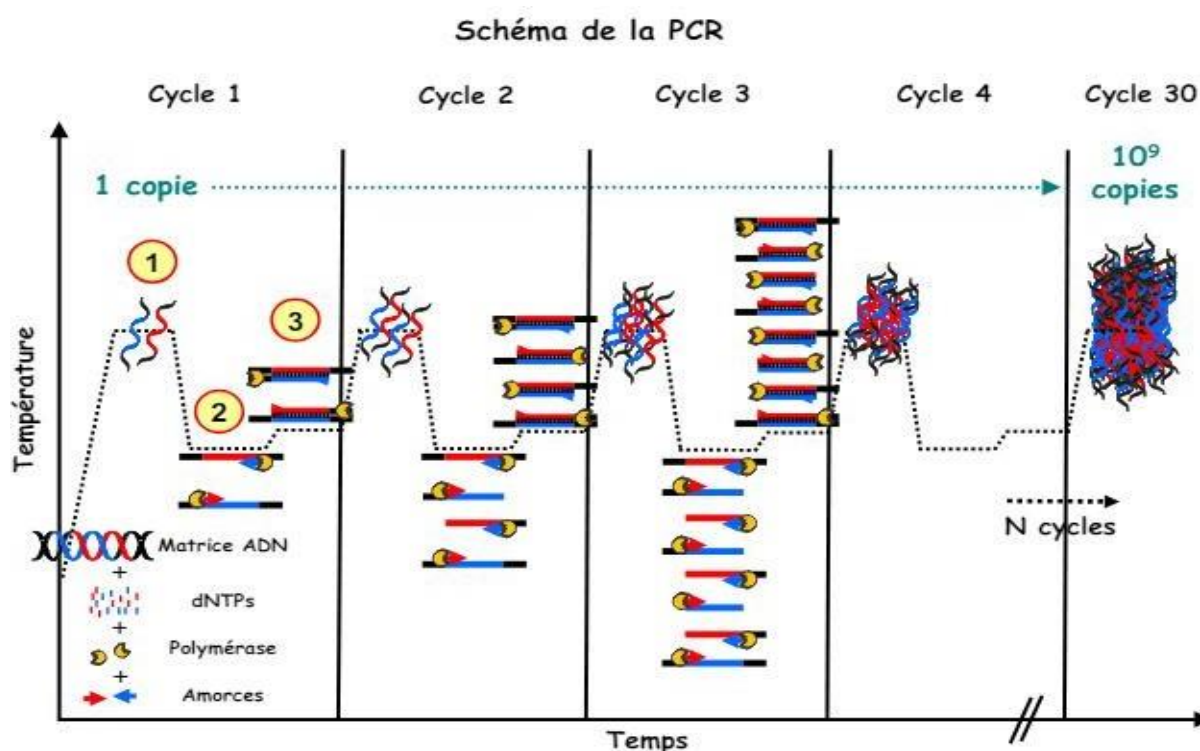


Figure 06 : Schéma démonstrative de la technique de PCR.

8.3 Principe

La Polymerase Chain Reaction (= PCR) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier spécifiquement et de manière exponentielle une séquence d'ADN donnée. Cette technique se prête bien à l'automatisation et des appareils effectuent désormais l'ensemble des opérations pour un grand nombre d'échantillons (Sylvia H, 2012).

Le principe de la PCR est simple. Il consiste à réaliser in vitro de nombreuses réplifications successives de l'ADN en utilisant comme amorces deux oligonucléotides de synthèse P1 et P2 s'hybridant spécifiquement aux extrémités 3' de la portion de séquence à amplifier.

La PCR (Polymerase Chain Reaction)

P1 est complémentaire du brin EB (ou brin codant) de l'ADN et P2 du brin 8 (ou brin non codant).

Il s'agit d'une réaction cyclique et chaque cycle comprend :

- dénaturation de l'ADN,
- hybridation des amorces P1 et P2,
- synthèse du brin complémentaire par l'enzyme ADN Polymérase.

a) L'ADN

Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile...). Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR (Martin Kemp, 2003).

b) Les deux amorces

Ce sont des fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN (Brenda Maddox, 2020).

Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de désoxyribonucléotides.

De plus, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier.

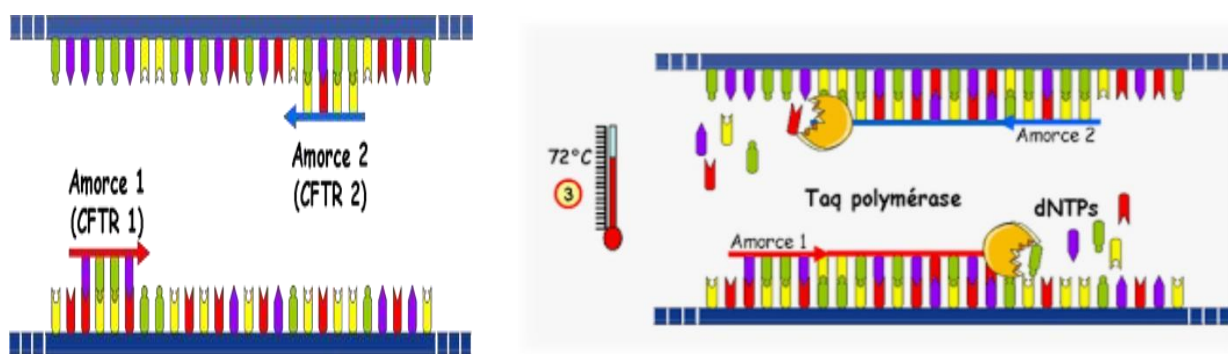


Figure 07 : représente les deux amorces.

c) Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Les dNTPs (Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

d) L'enzyme, Taq polymérase

L'enzyme utilisée est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce.

e) Le milieu réactionnel

Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs, les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium (MgCl₂). Ces deux derniers composants

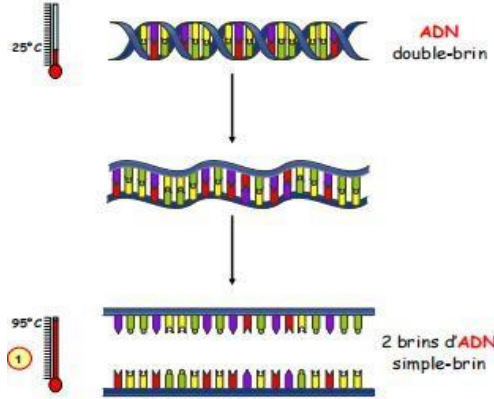
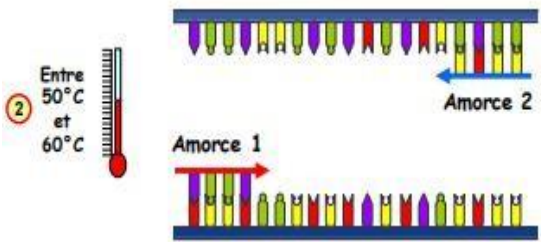
La PCR (Polymerase Chain Reaction)

Définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme

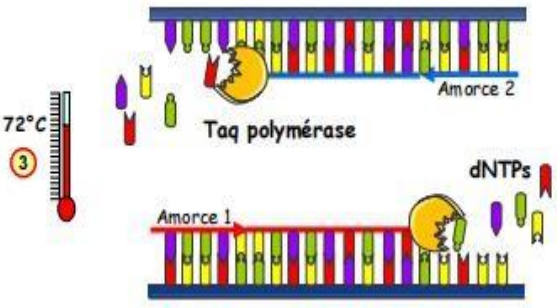
Chaque cycle est donc constitué de trois périodes différentes :

- Dénaturation
- Hybridation
- Elongation

Tableau 7: Les trois étapes différentes de PCR

Les étapes	Définition	Schéma démonstrative
La dénaturation :	<p>La température dans le tube est réglée à 95°C. A ce moment-là, l'ADN se dénature.</p> <p>En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice, les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN étant instables à cette Température. L'ADN double-brin (2 brins) est dénaturé en ADN simple brin (1 brin)</p>	
L' hybridation :	<p>Ensuite la température est descendue à la température dite d'hybridation. Cette Dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C et elle est fonction de la composition en déoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces. Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN.</p>	

La PCR (Polymerase Chain Reaction)

<p>L' élongation :</p>	<p>Puis la température est réglée à 72°C, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. 3</p> <p>Cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72 °C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon.</p>	
-------------------------------	---	--

9. Les types de la PCR

Voici quelques-uns des types de PCR les plus couramment utilisés :

1) PCR multiplexe

La PCR multiplexe (multiplex PCR) est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces par réaction de PCR. Les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et, éventuellement, le marqueur d'ADN. Il est également possible d'amplifier différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces.

2) Méta-PCR

Meta-PCR est une méthode qui permet de donner une molécule d'ADN synthétique comprenant n'importe quelle combinaison d'ADN amplifiable par PCR dans n'importe quel ordre. Elle est effectuée dans un seul tube et se compose de deux différentes étapes de la PCR séparées par un cycle de dégel pour éliminer l'activité résiduelle de la polymérase.

3) PCR asymétrique

C'est l'amplification par PCR en présence d'une faible quantité d'une des amorces. Elle permet le séquençage direct des fragments amplifiés. Pendant les 20 à 25 premiers cycles, l'ADN double brin est généré, jusqu'à épuisement de l'amorce limitante et de l'ADN simple brin est produit pendant les 5 à 10 derniers cycles.

4) PCR quantitative

La PCR quantitative (ou qPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces).

5) PCR semi-quantitative

La PCR semi-quantitative est basée sur l'interruption de la PCR en plusieurs cycles qui correspondent à la phase stationnaire (la quantité d'ADN augmente très doucement car il y a peu d'ADN matrice).

6) PCR en temps réel (RT-PCR)

La RT-PCR est utilisée pour détecter et quantifier l'ARN plutôt que l'ADN. Elle est couramment utilisée dans les études d'expression génique et la détection de virus.

7) PCR digitale (dPCR)

La dPCR divise l'échantillon en milliers de petites réactions individuelles, permettant la détection précise de faibles quantités d'ADN ou d'ARN.

8) PCR à point chaud (Hot Start PCR)

Cette variante utilise des amorces modifiées ou des enzymes spéciales pour réduire les amorces non spécifiques et améliorer la spécificité de l'amplification.

9.1 Technologies de détection

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers). Selon Wittwer et al. (1997), ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité (Bustin, 2000).

9.2 Applications

La PCR en temps réel, à cause de sa capacité à produire des résultats rapides, spécifiques et quantitatifs, trouve de plus en plus d'applications dans différents domaines. Bien que cette liste ne soit pas exhaustive, voici les exemples d'application les plus courants. La PCR en temps réel permet maintenant de réaliser des études plus fines d'expression génétique à partir de tissus ou de lignées cellulaires comme pour l'analyse quantitative de l'expression de différents gènes dans des études de modulation du cycle cellulaire avec des tissus exposés à des carcinogènes non génotoxiques (cic TNO BIBRA), les analyses de promoteurs dans des lignées cellulaires avec le gène reporter de la chloramphénicol acétyl transférase (Jeyaseelan et al, 2001), les études de modifications d'expression génétique dans les expériences drogues/réponses (drug/response), l'étude des ARNm variants résultant d'épissage alternatif (alternative splicing) (Vandenbroucke et al, 2001), etc. Elle peut aussi permettre de standardiser la quantité d'ADN de départ et d'évaluer la quantité d'ARNm en fin de réaction dans des études de transcription in vitro (Liu et al, 2002).

La PCR en temps réel s'avère aussi un outil puissant pour des analyses de mutations comme les SNPs et des études de génotypage à grande échelle comme pour le gène du récepteur d'œstrogène (Täpp et al, 2000). De plus en plus des tests utilisant la technologie des balises

La PCR (Polymerase Chain Reaction)

moléculaires sont dessinés pour la détection et la quantification rapide d'agents pathogènes viraux, bactériens et parasitaires. Vet et al (1999) ont déjà proposé un système multiplexe qui permet la détection et la quantification simultanées des rétrovirus HIV-1, HIV-2, des virus lymphotrophiques-T humains de type I et de type II avec un seuil de détection de 10 copies de génome et Poddar (1999) pour la détection d'adénovirus. Des tests de détection ont aussi été mis au point pour Salmonella avec une sensibilité de 2 CFU par réaction de PCR en temps réel (Chen et al, 2000) et de 1 CFU/ml après 6 h d'enrichissement pour Escherichia coli O157:H7 à partir d'échantillons de lait cru et de jus de pomme (Fortin et al, 2001). Chez les parasites, un test de PCR en temps réel a été développé pour Toxoplasma gondii (Lin et al, 2000). Plusieurs laboratoires travaillent présentement à la mise au point de nombreux autres tests diagnostiques pour différents agents pathogènes. Traditionnellement, l'analyse du nombre de copies d'un plasmide pour évaluer la stabilité génétique des collections de cellules était effectuée par transfert de Southern (Southern blot). La PCR en temps réel permet maintenant de réaliser ces analyses de façon beaucoup plus rapide et plus précise. Elle peut aussi être utilisée dans l'évaluation de la quantité d'ADN chromosomique contaminant ou résiduel bactérien ou de mammifères dans la production de protéines recombinantes. L'analyse de la bio-distribution d'un vecteur est un élément important dans l'évaluation de l'efficacité de protocoles de thérapie génique. La PCR en temps réel simplifie les études d'évaluation de la présence/absence d'ADN ou d'ARNm cible dans les différents tissus et permet de déterminer les conditions d'équilibre des ARNm exprimés (steady-state expressed mRNA).

- **La conception des amorces spécifiques**

La conception des amorces spécifiques est cruciale pour le succès de la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Voici pourquoi elle est si importante (VanGuilder HD,2008) :

- **Spécificité de l'amplification :**

Les amorces doivent être spécifiques à la séquence cible que vous souhaitez amplifier. Elles ne doivent pas correspondre à d'autres séquences non cibles, car cela entraînerait une amplification indésirable. Une conception soignée garantit que les amorces ne se lient qu'à la région d'intérêt.

- **Éviter les amorces non spécifiques :**

Si les amorces ont des correspondances avec d'autres séquences, cela peut entraîner une amplification incorrecte. Les amorces doivent être conçues de manière à minimiser les liaisons non spécifiques (Whiley DM,2005).

- **Température de fusion TM :**

La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La T_m est la température à laquelle les amorces se détachent de l'ADN cible. Des amorces avec des T_m similaires garantissent une amplification efficace. Un T_m trop bas peut entraîner des amorces instables, tandis qu'un T_m trop élevé peut entraîner une amplification efficace. Un T_m trop bas peut entraîner des amorces instables, tandis qu'un T_m trop élevé peut entraîner une amplification inefficace (Sipos R et al.,2012).

Longueur et composition des amorces :

- Les amorces doivent avoir une longueur d'environ 18 à 24 bases.
- Le contenu en GC doit être d'environ 40 à 60 %.
- Commencez et terminez les amorces avec 1 à 2 paires de bases G/C.
- Évitez les régions complémentaires entre les amorces.

Éviter les structures secondaires :

Les amorces ne doivent pas former de structures secondaires telles que des boucles ou des cheveux de boucle. Cela pourrait perturber l'amplification.

Orientation des amorces :

Les amorces doivent s'hybrider de manière complémentaire et antiparallèle aux brins de l'ADN cible. L'amorce sens s'apparie au brin anti-sens, et l'amorce anti-sens s'apparie au brin sens, toutes deux dirigées de l'extrémité 5' vers 3' car ils sont riches en C et G

Éviter les dimères d'amorces :

Les dimères d'amorces sont des liaisons entre les amorces elles-mêmes. Ils peuvent perturber l'amplification. La conception doit éviter les régions complémentaires entre les amorces (Sipos R et al.,2012).

La PCR (réaction en chaîne par polymérase) est une technique fondamentale en biologie moléculaire. Elle permet d'amplifier spécifiquement des séquences d'ADN, facilitant ainsi leur étude et leur analyse. Son impact est immense, que ce soit en recherche fondamentale, en médecine diagnostique, ou dans d'autres domaines comme la criminalistique et l'archéologie. Grâce à sa sensibilité et sa rapidité, la PCR a ouvert de nouvelles perspectives dans de nombreux domaines, permettant des avancées significatives dans la compréhension des maladies génétiques, la détection des agents pathogènes, et même la manipulation génétique. En conclusion, la PCR demeure une technique essentielle et incontournable dans le domaine de la biologie moléculaire, contribuant de manière significative aux progrès scientifiques et médicaux.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1.1 Objectif

L'objectif de notre travail est d'exploiter des outils de la bio-informatique afin de concevoir des amorces spécifiques encadrant le gène *RPSL*, impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez la bactérie *Escherichia coli*.

L'utilisation des amorces pour amplifier un gène, suivie de son séquençage pour identifier les mutations responsables de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'étude des variantes et la recherche de solutions de traitement.

1.2 But

Le but de notre travail est de démontrer que notre paire d'amorces spécifiques peut être utilisée pour réaliser des analyses PCR. Ces analyses permettront d'explorer l'impact des gènes *RPSL* sur *Escherichia coli*, ainsi que leur relation avec la résistance bactérienne aux antibiotiques. L'objectif ultime est de détecter les variants associés à cette résistance.

1.3 La séquence du gène RPSL

En utilisant la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI), nous avons effectué une recherche de la séquence du gène *RPSL*. Le NCBI est une ressource en ligne fournissant un large éventail d'informations en biologie moléculaire, génomique, et autres domaines connexes. En accédant au site web du NCBI à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/all/>, nous avons pu consulter les données pertinentes concernant le gène *RPSL* (voir figures 8 et 9).

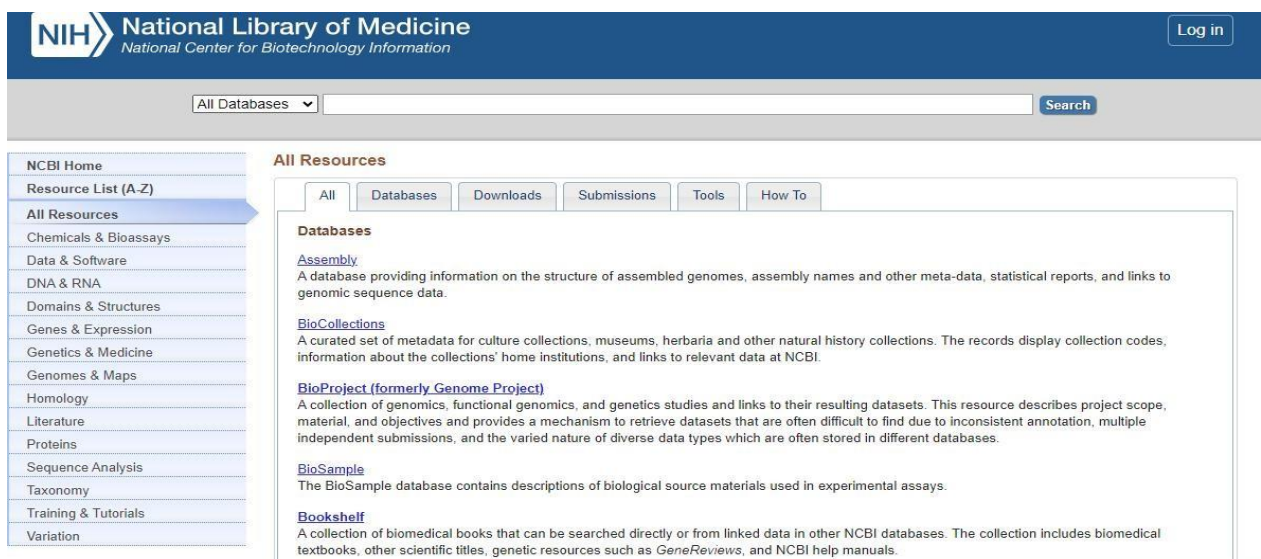


Figure 10: L'interface de la base de données « National Center for Biotechnology Information (NCBI) ».

Le National Center for Biotechnology Information (NCBI) est une branche du National Institutes of Health (NIH) aux États-Unis. Son principal objectif est de collecter, stocker et fournir un accès public à une vaste gamme de ressources biologiques et génétiques. NCBI gère plusieurs bases de données importantes, notamment PubMed, une base de données de publications médicales, GenBank, une base de données de séquences génétiques, et d'autres ressources liées à la bioinformatique et à la génomique. Le site web du NCBI est une ressource précieuse pour les chercheurs, les professionnels de la santé et le grand public intéressé par la biologie et la médecine. Cette partie des amorces a été choisie en raison de sa richesse en variantes.

```

1117 aaca aggcgttcgc acactaccgt
1141 tggttatccc ttcggagttt tagtcaccag gcgggcgctt ccagtaagca gccccgtttg
1201 ggctacttaa attgaacgcc taaaagataa acgaggaaac aaatggctcg tacaacaccc
1261 atcgcacgct accgtaacat cggtatcagt gcgcacatcg acgccggtaa aaccactact
1321 accgaacgta ttctgttcta caccgggtga aaccataaaa tcggtgaagt tcatgacggc
1381 gctgcaacca tggactggat ggagcaggag caggaacgtg gtattaccat cacttccgct
1441 gcgactactg cttctggtc tggatggct aagcagtatg agccgcatcg catcaacatc
1501 atcgacaccc cggggcacgt t
[ gap 100 bp ] Expand Ns
1622 gaattcctg aagtatgatg aagcgccgag taacgttgct caggccgtaa ttgaagcccg
1681 tggtaaataa gcctaagggt taataccaaa gtcccgtgct ctctcctgaa ggggagagca
1741 caatagtaag gaatatagcc gtgtctaaag aaaaatttga acgtacaaaa ccgcacgtta
1801 acgttggtac tatcggccac gttgaccacg gtaaaactac tctgaccgct gcaatacca
1861 ccgtactggc taaaacctac ggcggtgctg ctctgtcatt cgaccagatc gataacgcgc
1921 cgggaagaaaa agctcgtggt atcaccatca acacttctca cgttgaatac gacaccccga
1981 cccgtcacta cgcacacgta gactgcccgg ggacgcccga ctatgttaaa aacatgatca
2041 ccggtgctgc tcagatggac ggcgcatcc tggtagttgc tgcgactgac ggcccgatgc
2101 cgcgactcg tgagcacatc ctgctgggtc gtcaggtagg cgttccgtac atcatcgtg
2161 tcctgaacaa atgcgacatg gttgatgacg aagagctgct ggaactggtt gaaatggaag
2221 ttcgtgaact tctgtctcag tacgacttcc cgggcgacga cactccgatc gttcgtggtt
2281 ctgctctgaa agcgttgaa ggcgacgacg agtgggaagc gaaaatcctg gaactggctg
2341 gcttccctgga tctttatatt ccggaaccag agcgtgcatg tgacaagccg ttcctgtgctc
2401 cgatcgaaga cgtattctcc atctccggtc gtggtaccgt tgttaccggt cgtgtagaac
2461 gcggtatcat caaagtgggt gaagaagttg aaatcgttgg tatcaaagag actcagaagt
2521 ctacctgtac tggcgttgaa atgttccgca aactgctgga cgaaggccgt gctggtgaga
2581 acgtaggtgt tctgctgctg ggtatcaaac gtgaagaaat cgaacgtggt caggtactgg
2641 ctaagccggg caccatcaag ccgcacacca agttcgaatc tgaagtgtac attctgtcca
2701 aagatgaagg cggcgtcat actccgttct tcaaaggcta ccgtccgcat tctacttcc
2761 gtactactga cgtgactggt accatcgaac tgccggaagg cgtagagatg gtaatgccgg
2821 gcgacaacat caaatgggt gttaccctga tccaccgat cgcgatggac gacggtctgc
2881 gtttcgcaat ccgtgaaggc ggccgtaccg ttggcgccgg cgttgttgct aaagtcttgg
2941 gctaattgca cgtagtcag tcttgaactg aaagggcgcg tcgggcccctt gtaag
[ gap 100 bp ] Expand Ns

```

Figure 11: La séquence du gène *RPSL* à partir de la base de données «NCBI».

1.4 L'amorce spécifique du gène *RPSL*

Pour concevoir une amorce spécifique pour le gène *RPSL*, on a utilisé le logiciel Primer-BLAST, disponible gratuitement sur la plateforme du Centre National pour l'Information Biotechnologique (NCBI) à l'adresse suivante : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Primer BLAST est un outil bioinformatique fourni par le NCBI, il est utilisé pour concevoir des amorces ou des sondes PCR (réaction en chaîne par polymérase) pour amplifier spécifiquement les séquences d'ADN cibles. Cet outil prend une séquence d'ADN **cible** en entrée et génère des amorces spécifiques qui peuvent être utilisées pour amplifier sélectivement cette séquence lors d'une réaction PCR.

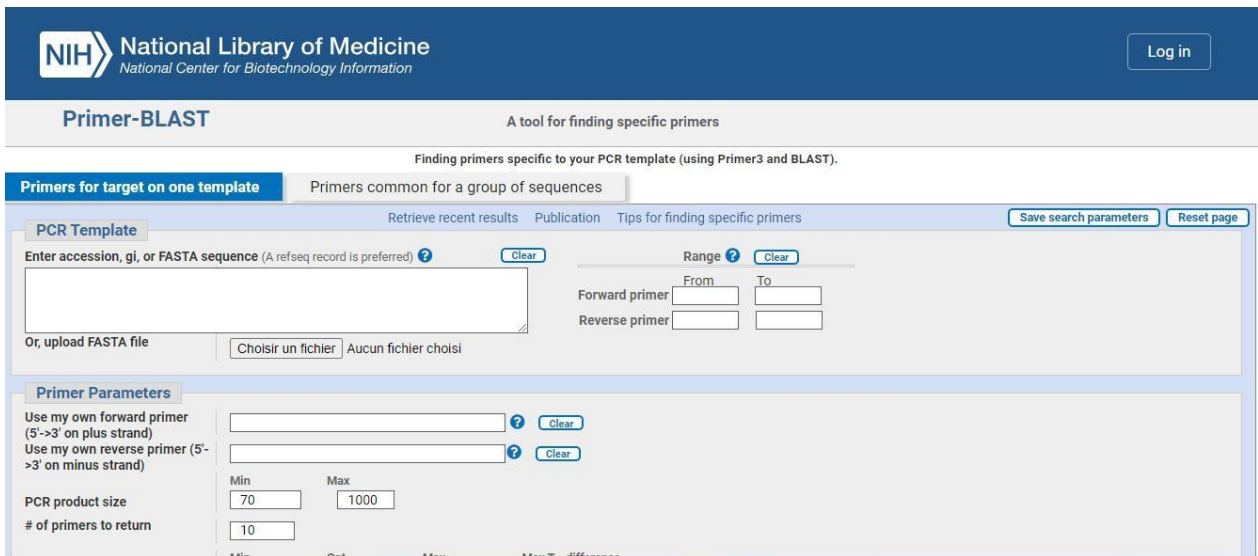


Figure 12: Interface de l'outil Primer BLAST

Pour délimiter la zone où localiser l'amorce sens, nous avons choisi la portion de séquence allant du début jusqu'au nucléotide 463. Ensuite, en cliquant sur "Révision", puis sur l'option "Statistiques", une fenêtre s'affiche, demandant de saisir des données chiffrées.

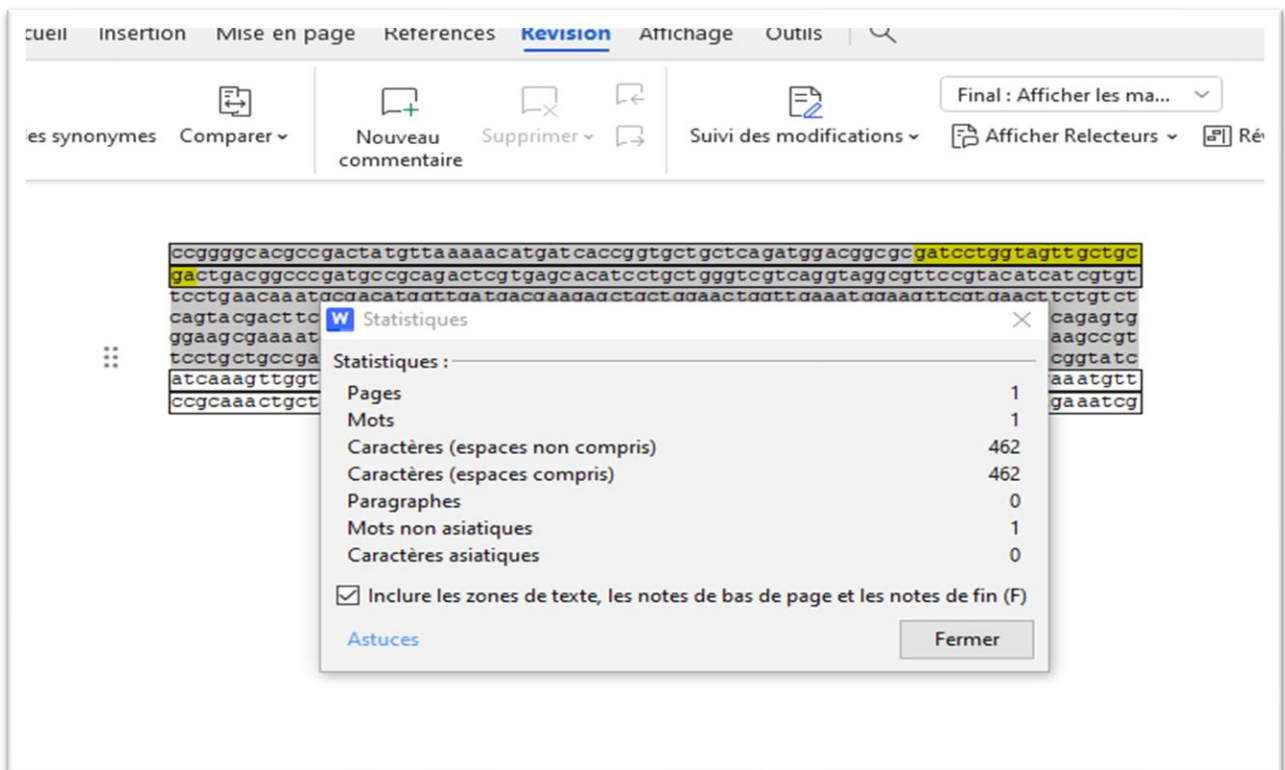
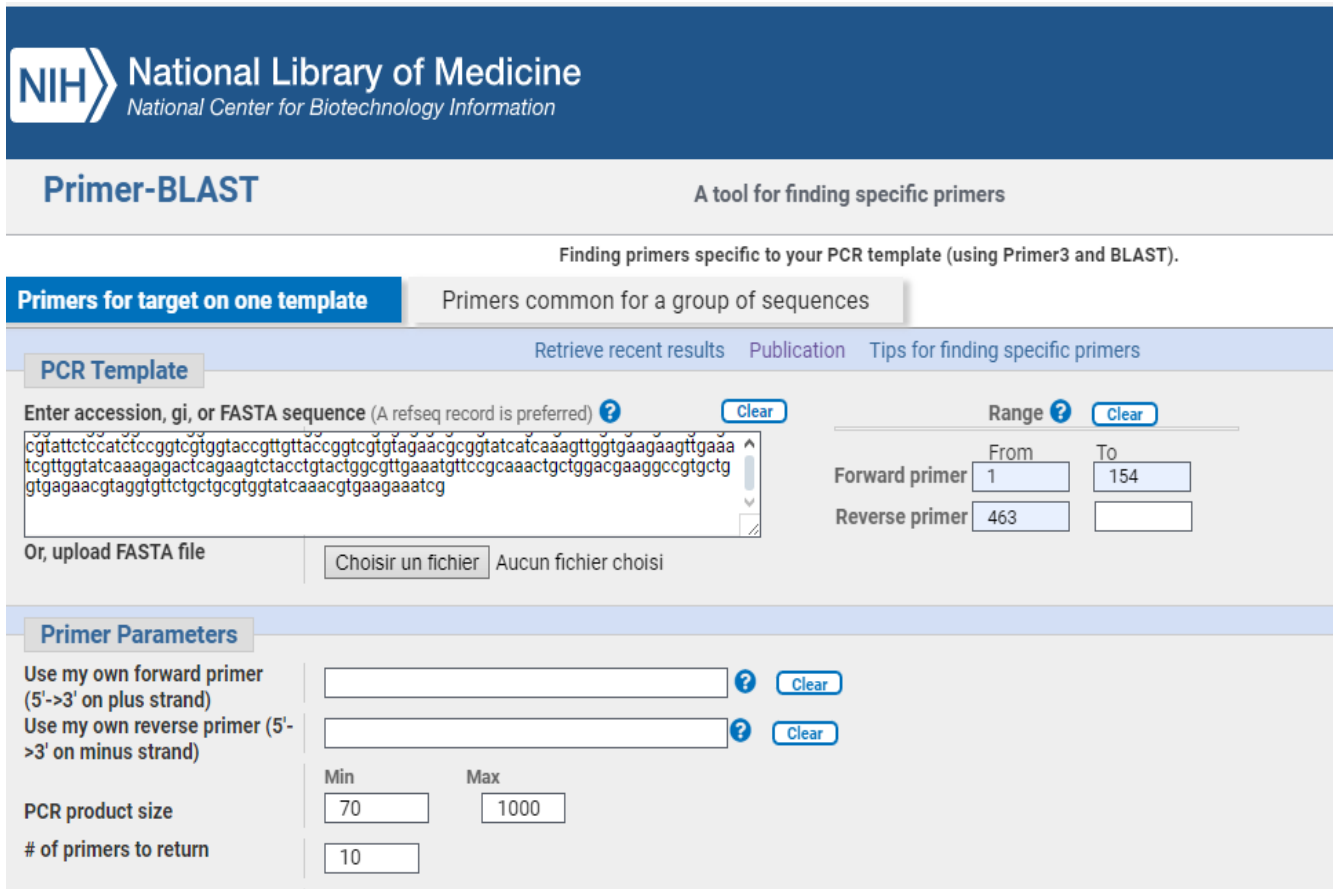


Figure 13: La numération des bases.

Après cela, nous avons copié et collé la séquence que nous voulons amplifier dans Primer BLAST, en supprimant les espaces indésirables entre les nucléotides.



NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template | Primers common for a group of sequences

Retrieve recent results | Publication | Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)

```
cg'tattctccatcfcggctcgtggtaccgttggtaccggtcgtgtagaacgcggtatcatcaagttggtgaagaagttgaaa
tcg'ttggtatcaaaagagactcagaagtctacctgtactggcgttgaaatgttccgcaaaactgctggacgaaggccgtgctg
gtgagaacgtagggttctcgtcgtggtatcaaacgtgaagaaatcg
```

Or, upload FASTA file Aucun fichier choisi

Range

	From	To
Forward primer	1	154
Reverse primer	463	

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

PCR product size

Min	Max
70	1000

of primers to return

Figure 14: Utilisation du Logiciel primer-BLAST

Résultats et discussion

Résultats et Discussion

1. Résultats du Primer-BLAST

Le logiciel Primer-BLAST donne un choix de dix paires d'amorces représentés ci-dessous (figure 14), et leur disposition par rapport à la séquence de référence représentée en rouge dans la figure.

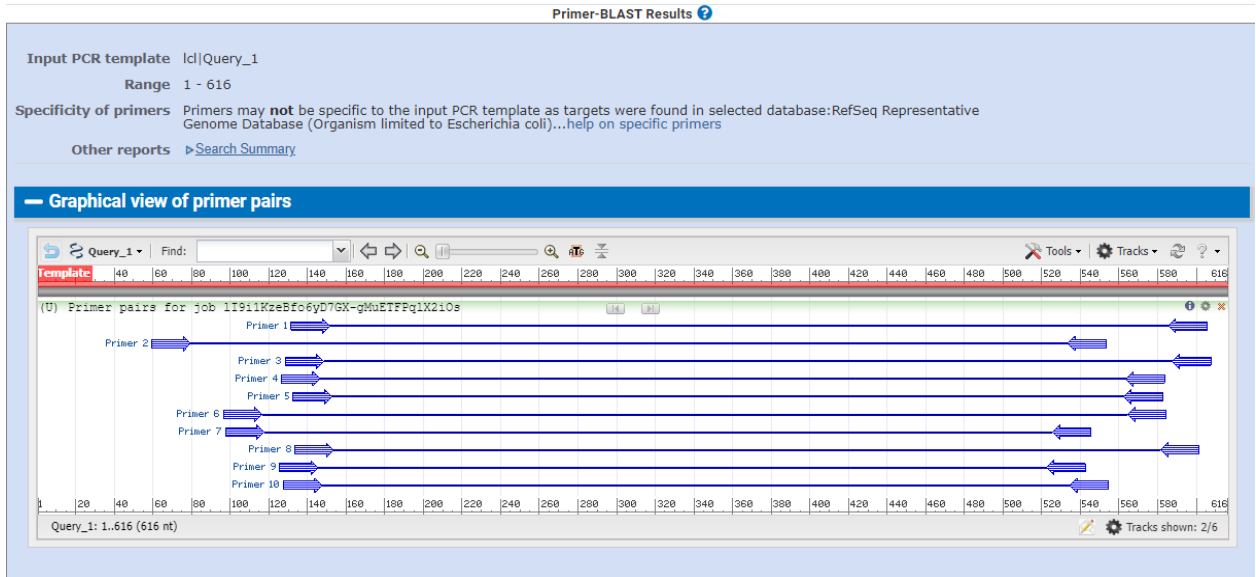


Figure 15: Vu graphique des résultats (10 paires d'amorces).

2. Choix de la paire d'amorces

Le choix de la deuxième paire d'amorces parmi les dix proposées a été basé sur les caractéristiques distinctives qu'elle présente.

Primer pair 2

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GATCCTGGTAGTTGCTGCGA	Plus	20	60	79	59.82	55.00	4.00	3.00
Reverse primer	CCAGCAGTTTGCAGAACATT	Minus	20	553	534	59.69	50.00	4.00	2.00
Product length	494								

Products on intended targets

>NC_000913.3 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome

product length = 494

Forward primer 1 GATCCTGGTAGTTGCTGCGA 20
 Template 3471024 3471005

Reverse primer 1 CCAGCAGTTTGCAGAACATT 20
 Template 3470531 3470550

Products on potentially unintended templates

>NC_002695.2 Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome

product length = 494

Forward primer 1 GATCCTGGTAGTTGCTGCGA 20
 Template 4985393 4985412

Reverse primer 1 CCAGCAGTTTGCAGAACATT 20
 Template 4985886 4985867

product length = 494

Forward primer 1 GATCCTGGTAGTTGCTGCGA 20

Figure 16: Choix de la paire 2 parmi les résultats de primer BLAST

Résultats et Discussion

Cette paire d'amorces a été choisie en raison de sa spécificité, garantissant qu'elle n'amplifie aucun produit non spécifique (figure 15), ainsi qu'un bon pourcentage en GC et des températures de fusion (Tm) similaires pour les deux amorces sens et antisens.

```

ccggggcagccgactatgttaaaaacatgatcaccgggtgctgctcagatggacggcgcgatcctggtagttgctgc
gactgacggcccgatgccgcagactcgtgagcacatcctgctgggtcgtcaggtaggcgttccgtacatcatcgtgt
tctgaacaaatgcgacatggttgatgacgaagagctgctggaactggttgaatggaagttcgtgaacttctgtct
cagtacgacttcccgggcgacgacactccgatcgttcgtgggttctgctctgaaagcgtggaaggcgacgcagagtg
ggaagcgaaaatcctggaactggctggcttccctggattcttatattccggaaccagagcgtgcgattgacaagcgt
tctgctgccgatcgaagacgtattctccatctccggctcgtggtaccggtggtaccggtcgtgtagaacgcgggtatc
atcaaagttggtgaagaagttgaaatcgttgggtatcaaagagactcagaagtctacctgtactggcggttgaatggt
ccgcaaacctgctggacgaaggccgtgctggtgagaacgttaggtggtctgctgctggtggtatcaaacgtgaagaaatcg

```

Forward primer : GATCCTGGTAGTTGCTGCGA

**Reverse primer : CCAGCAGTTTGCGGAACATT
GGTCGTCAAACGCCTTGTA**

AATGTTCCGCAAACCTGCTGG

Figure 17: Position des amorces sens (Forward) et antisens (Reverse) dans la séquence du gène *RPSL*.

Tableau 8: Caractéristiques de la paire d'amorce choisies

Critères d'une bonne amorce	Taux optimal	Nos amorces
Longueur	15 à 30 nucléotides	sens 20 nucléotides antisens 20 nucléotides
Température de fusion	52 à 60 °C	Sens (59.82 °C) antisens (59.69 °C)
Teneur en CG	40 à 60%	sens 55% antisens 50%
Produits spécifique	Moins de 800 pb	494 pb
Produits aspécifique	Plus de 900 pb	Aucun

3. Interprétation des résultats

L'intégrité de la séquence du gène *RPSL* a été extraite du programme genbank . À partir du programme Primer-BLAST, nous avons obtenu 10 paires d'amorces spécifiques pour ce gène. La paire d'amorces 2 a été sélectionnée en raison de ses paramètres optimaux :

- ✓ La longueur du produit d'amplification spécifique est de 494 pb, ce qui est inférieur à la limite de 900 pb pour une PCR efficace.
- ✓ Les amorces directe et inverse ont une longueur de 20 pb chacune.
- ✓ Les températures de fusion des deux amorces sont très proches selon le tableau 10.
- ✓ La teneur en GC est de 55% pour l'amorce directe et de 50% pour l'amorce inverse.
- ✓ Aucun produit aspécifique n'est observé.

Cette paire d'amorces répond aux critères requis pour une amplification spécifique du gène *RPSL*.

4. Confirmation des résultats

Malheureusement, pour valider nos résultats, nous avons réalisé une "PCR in silico" en utilisant le site Web <https://genome.ucsc.edu/>. Cependant, les résultats obtenus étaient spécifiques au gène humain, et aucune information n'a été trouvée concernant *Escherichia coli*. Cette méthode n'a pas permis de confirmer la spécificité des amorces sélectionnées.

5. Les outils utilisés dans cette recherche

Nous avons exploité plusieurs outils bio-informatiques dans notre recherche :

- ✚ NCBI, le Centre national d'information sur la biotechnologie, offrant une gamme de ressources biologiques et génétiques.
- ✚ Primer-BLAST, un outil hébergé sur NCBI, utilisé pour trouver des amorces spécifiques pour la PCR.
- ✚ In-Silico PCR, une méthode permettant de simuler la PCR pour un ensemble d'amorces donné. Elle permet d'optimiser la conception des amorces en fonction de l'ADN cible. Ce processus a été présenté par (**Schuler en 1997**). Cela permet d'évaluer la spécificité et l'efficacité des amorces avant de les utiliser dans des expériences réelles de PCR.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVE

Conclusion et Perspectives

Dans cette étude visant à élaborer des amorces pour le gène *RPSL* afin d'étudier la résistance d'*E. coli* aux antibiotiques, nous avons utilisé une approche bioinformatique pour concevoir des amorces spécifiques et efficaces. En utilisant les outils disponibles tels que NCBI et Primer-BLAST, nous avons sélectionné une paire d'amorces répondant à des critères rigoureux, notamment une longueur optimale, une température de fusion adéquate, une teneur en GC équilibrée et l'absence de produits non spécifiques.

Après avoir conçu les amorces, Cette approche nous a permis de vérifier que nos amorces ciblaient spécifiquement le gène *RPSL*, fournissant ainsi une base solide pour nos futures expériences PCR en laboratoire. En résumé, des amorces du gène *RPSL* ont été développées pour les études de résistance d' *E. coli* aux antibiotiques. Ces amorces sont des outils importants pour approfondir notre compréhension des mécanismes de résistance et développer de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections bactériennes.

Grâce aux outils de la bio-informatique, on a pu choisir les amorces servant à l'amplification du gène *RPSL*. La paire d'amorce 2 spécifique a été obtenue. Cette paire d'amorces est conforme aux normes internationales (Température de fusion : 59°C, longueur : 20 nucléotides, produits spécifiques : 494 pb et aucun produits aspécifiques.

L'utilisation des amorces pour amplifier un gène, suivie de son séquençage pour identifier les mutations responsables de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'étude des variantes et la recherche de solutions de traitement.

L'étude de la relation entre *Escherichia coli*, le gène *RPSL* et la résistance aux antibiotiques met en lumière les mécanismes moléculaires qui permettent à cette bactérie de survivre en présence de traitements antibiotiques. Le gène *RPSL*, codant pour la protéine ribosomique S12, est une cible critique pour les antibiotiques tels que la streptomycine. Les mutations dans ce gène peuvent altérer la structure de la protéine S12, diminuant ainsi l'efficacité de l'antibiotique et conférant une résistance à la bactérie

Ce travail a permis de nous initier aux outils Bio-informatiques et nous familiariser avec l'analyse des séquences génomiques, ainsi qu'une compréhension de l'importance du choix des amorces avant toute étude de génotypage dans une population donnée.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- **ABRAHAM, M.** (2018). Identification des souches d'Escherichia coli dans les selles en rapport avec la malnutrition à Diourbel. Mali: Université des Sciences, des Techniques et Technologies de Bamako.
- **AFSSA** (2003). Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC). Maisons-Alfort France 2003. Pp : 220.
- **ANDRADE, J.R., DA VEIGA, V.F., DE SANTA ROSA, M.R. ET SUASSUNA, I.** (1989). An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic Escherichia coli. J Med Microbiol 28: 49-57.
- **BACHMANN BJ** (1983) Linkage map of Escherichia coli K-12, Edition 7. Microbiol Rev 47:180–230 bactéries responsables d'infections urinaires. Mémoire pour l'obtention d'un master : Tlemcen. Université de Tlemcen, 74p
- **BENNANI M.** (2014). Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu isolées dans les selles. Projet fin d'étude. Institut Pasteur : Sidi Mohamed ben Abdallah. 31 P.
- **BENTLEY, R, MEGANATHAN, R.,** Biosynthesis of Vitamin K (menaquinone) in Bacteria, Bacteriological Reviews, 1982, 46(3):241-280.
- **Benz, I. et Schmidt, M.A.** (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of diarrhoeagenic Escherichia coli strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. Mol Microbiol 6: 1539-1546.
- Bergey's manual 2012
- **Björkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI** (2000) Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. Science 287(5457):1479–1482
- **Blattner, F.R., Plunkett, G.I., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., et al.** (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. Science 277: 1453±1474.
- **BOULAHBAL F.** microbiologie s1 clinique .Ben aknoun (Alger).office des publications
- **Brenner, D. J., Fanning, G. R., Skerman, F. J., AND Stanley, F.** (1972). Polynucleotide Sequence Divergence Among Strains of Escherichia coli and Closely Related Organisms. Journal of Bacteriology. Vol: 109. Pp: 953- 965.
- **CHALMERS, R., & AIRD, D. F.** (2000). Waterborne Escherichia coli O157. Journal of Applied Microbiology , 88, 124-132.

- **CHANDRA SANYAL S, LILJAS A.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 633-6, (2000). View article PMID: 11114498
- **CHEN, J.; XIE, S.** Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms. *Sci. Total Environ.* 2018, 640–641, 1465–1477. [Google Scholar]
- **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., LECLERCQ R., BINGEN E.** (2006). *Antibiogramme*. ESKA. Paris P 465
- **DUVAL J., SOUSSY C. J.** (1990). *Antibiothérapie*. Masson, 4ème édition.
- **EMILIO BG, FELIPE C, EDUARDO LVA, JESÚS M, JOSÉ B.** Use of a dominant rpsL allele conferring streptomycin dependence for positive and negative selection in *Thermus thermophilus*. *Applied & Environmental Microbiology*. 2007;73(16):5138–45. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- **FENG P.** (1995). *Escherichia coli* serotype O157: H7 Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic variants. *Emerging Infectious Diseases*. Vol: 1. Pp: 47- 52.
- **FONG, J. S., DE CHADAREVIAN J. P., AND KAPLAN B. S.** (1982) Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. *Pediatr Clin North Am* 29:835-856.
- **FONTAINE M.** (1992). *Vade mecum du vétérinaire, formulaire vétérinaire de pharmacologie, de thérapeutique et d'hygiène*, 15ème édition, 106-119. Volume 1.
- from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Infect Immun* 65:3799-3805.
- **GRIFFIN, P., AND TAUXE, RV.** (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other
- **GRIFFIN, P., AND TAUXE, RV.** (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13:60-98.
- **GUERRA, B.; JUNKER, E.; HELMUTH, R.** Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene sul3 among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 2712–2715. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version].
- **GUTHRIE C, NASHIMOTO H, NOMURA M** (1969) Structure and function of *E. coli* ribosomes, VIII. Cold-sensitive mutants defective in ribosome assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:384–391
- **HOA, P.T.P.; NONAKA, L.; VIET, P.H.; SUZUKI, S.** Detection of the sul1, sul2, and

- sul3 genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Sci. Total Environ.* **2008**, 405, 377–384. [[Google Scholar](#)]
- **HOFMANN, S. L.** (1993) Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci* 306:398-406.
 - **HRYNIEWICZ, W., & MICIULEVICIENE, J.** (2008). European antibiotic awareness day: a five-year perspective of Europe-wide actions to promote prudent use of antibiotics. *Eurosurveillance*, 13(46), 19075.
 - **JARBOUI, A. SELLAMI, H. SELLAMI, F. CHEIKHROUHOU, F. MAKNI ET A. AYADI**, « Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jiroveci* strains isolated from immunocompromised patients », *Pathologie Biologie*, vol. 59, 2011, p. 222-225 (ISSN 0369-8114, DOI <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.02.001>, lire en ligne [archive])
 - **JERSE A. E., YU, J., TALL B. D., KAPER J. B.** (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol: 87. Pp: 7839- 7843.
 - **JOHNSON L. M., HARGRETT N. T., BLAKE P. A., AND COHEN M. L.** (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308:681-685.
 - **KAPER, J. B., J. P. NATARO AND H. L. MOBLEY** (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol* 2(2): 123-140.
 - **KOVACS, M. J., RODDY, J., GREGOIRE, S., CAMERON, W., EIDUS, L. & DROUIN, J.** (1990). l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*
 - **LARRY M. BUSH, MD, FACP, Charles E. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University, 2022.**
 - **LAUER, MIKE** (May 31, 2016). "How Many Researchers?". Open Mike. NIH. Archived from the original on August 25, 2016. Retrieved June 6, 2016
 - **LAZOUL K., RAHI I.** (2014). Etude des mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques dans la région de Touggourt. Mémoire. Université kasdi Merbah Ouargla. 66 P.
 - **LEVI-MONTALCINI, R.** (1987) The nerve growth factor: thirty-five years later. *Science* 237, 1154±1162.
 - **LI N, QIN T, ZHANG XL, HUANG B, LIU ZX, XIE HX, ET AL.** Gene Deletion Strategy To Examine the Involvement of the Two Chondroitin Lyases in *Flavobacterium*

- columnare Virulence. Appl Environ Microbiol. 2015;81(21):7394–402. 10.1128/AEM.01586-15 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **LIAZID A.** (2012). Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du CHU de Tlemcen. Mémoire. Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers. 95 P
 - **LOZNIIEWSKAI A., RABAUD N.** (2010).résistance bactérienne aux antibiotiques.[en ligne].
 - **M. LEVY SB,** Antibacterial resistance worldwide:causes, challenges and resposnes, Nat Med, 2004.
 - **MAMMERI H.** (2013). Mode d'action des antibiotiques. Service de bactériologie, CHU Amiens.P : 2.
 - **MARIANI PATRICIA -KURKDJIANA, STEPHANE BONACORSIA.** (2016). Diagnostic des infections à Escherichia coli entérohémorragique. Francophone Des Laboratoires. Vol: 486. Pp: 49.
 - **MARTINEZ-MARTINEZ, L., PASCUAL, A., & JACOBY, G. A.** (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. The Lancet, 351(9105), 797-799.
 - **MESSAILI, C.; MESSAI, Y.; BAKOUR, R.** Virulence gene profiles, antimicrobial resistance and phylogenetic groups of fecal Escherichia coli strains isolated from broiler chickens in Algeria. Vet. Ital. **2019**, 55, 35. [[Google Scholar](#)]
 - **MEZIANI M.** (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans Microbiologie pharmaceutique, Université de Renne, France.
 - **MINH-DUY PHAN, (...) MARK A. SCHEMBRI,** « Plasmid-Mediated Ciprofloxacin Resistance Imparts a Selective Advantage on Escherichia coli ST131 », *ASM Journals Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 66, n° 1, 18 janvier 2022 ([DOI 10.1128/AAC.02146-21](#), [lire en ligne \[archive\]](#), consulté le 23 janvier 2022).
 - **NAUCIEL C., VILDE J.L.** (2007). Bactériologie médicale. Elsevier Masson SAS .P 122-123.
 - **Nguyen H.C., Karray F., Lautru S., Gagnat J., Lebrihi A., Huynh T.D. et Pernodet J.L.** Glycosylation steps during spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*: involvement of three glycosyltransferases and their interplay with two auxiliary proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 54:2830-2839
 - **OMS | Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale.** WHO. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>.
 -

- **PANTEL**, Multirésistances des enterobacteries au antibiotiques et modulation de l'influx et l'efflux membranaires chez E.coli ST131, 2016.
- **PATON, A. W., VOSS E., MANNING P. A. AND PATON J. C.** (1997) Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates
- **PEBRET F.** (2003). Maladies infectieuses : toutes les pathologies des programmes officielles des études médicales paramédicales. Heurs de France. France. P 65.
- **PRICE R.** O'Neill report on antimicrobial resistance: funding for antimicrobial specialists should be improved. Eur J Hosp Pharm. 2016;23(4):245-247. doi:10.1136/ejhpharm-2016-001013
- **R. C. LOZNIIEWSKI A,** «Résistance bacterienne aux antibiotiques,» CCLIN SudEst, 2010.
- **RAHAL K.** (2013). Les antibiotiques. Office des publications universitaires. Alger.P :15, 47, 79, 80, 101,133.
- **RAMAKRISHNAN V, MOORE PB. CURR. OPIN. STRUCT. BIOL. 11, 144-54,** (2001). View articlePMID: 11297922
- **Riley, M. et al.** (2006) *Nucleic Acids Res* **34**:1-6 (corrected supplemental data from B. Wanner) enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev 13:60-98.
- **Schuler, G. (1997).** Sequence mapping by electronic PCR. *Genome research* , 541–550.
- **Sharp, J. C., Ritchie L. D., Curnow J. and Reid T. M.** (1994) High incidence of haemorrhagic colitis due to Escherichia coli O157 in one Scottish town: clinical and epidemiological features. J Infect 29:343-350.
- **SINGLETON, P.** (2004). Bactériologie, pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6eme édition ; Edition Dunod. Clannaborough Barton.
- **Su, C., and Brandt L. J.** (1995) Escherichia coli O157:H7 infection in humans. Ann Intern Med 123:698-714.
- **Sylvie C.** (2009). Résistance aux antibiotiques : Un enjeu de santé publique important. Journal de Pharmactuelle. 42 :12.
- **Tao, R.; Ying, G.; Su, H.; Zhou, H.; Sidhu, J.P.S.** Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. Environ. Pollut. 2010, 158, 2101–2109. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- **Tao, R.; Ying, G.; Su, H.; Zhou, H.; Sidhu, J.P.S.** Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. Environ. Pollut. **2010**, 158, 2101–2109. [[Google Scholar](#)]

- **Tarr, P.** (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20:1-8.
- **Vernozy-Rozand, C., Bouvet, J., Montet, M.P., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy Cruchaudet, C., and Richard, Y.** (2002). Survey of retail raw milk cheeses for Verotoxin producing *E.coli* (VTEC) and *E. coli* O157: H7 in France (Poster). In: 102th General Meeting of American Society for Microbiology May, 19- 20 Salt- Lake City, USA
- **Véronique f. (2003).** La résistance bactérienne aux antibiotiques. [En ligne]. classeur.pistes.org/chantier/theme/292/resistance_-_document_d_information.doc. (Consulté le 22-03-2024).
- **Vial, P. A., Robins-Browne R., Lior H., Prado V., Kaper J. B., Nataro J. P., Maneval D., Elsayed A. and Levine M. M.** (1988) Characterization of enteroadherent aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 158:70-79.
- **Wilson, J. B., S. A. McEwen, R. C. Clarke, K. E. Leslie, R. A. Wilson, D. Waltner-Toews, and C. L. Gyles.** (1992). Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol. Infect.* Vol: 108. Pp: 423-439.

