

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur
3^{ème} cycle LMD

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : *Génétique Moléculaire*

N° d'ordre : 02/BA/2023
N° de série : 15/D392023

Intitulé :

Étude des gènes de pathogénicité des souches d'*Escherichia coli*

Présentée et soutenue par : MEZIANI Dahbia Yasmina

Le 18/04/2023

Jury d'évaluation :

Président : BENHIZIA Yacine - Professeur - Université Constantine 1

Directeur : REZGOUN Mohamed Larbi - MC(A) - Université Constantine 1

Examineurs : SEKHRI-ARAFI Nedjoudja - MC(A) - Université Constantine 1

DEKKICHE Samia - MC(A) - Université Mostefa Ben Boulaïd - Batna 2

Année universitaire
2022 - 2023

*Au Nom d'Allah, le Tout
Miséricordieux,
le Très Miséricordieux*

*Merci dieu tout puissant, qui m'a honoré d'être parmi ceux
qui savent lire et écrire, et qui a guidé mes pas sur le chemin
de la science.*

Je l'implore de m'éclairer et de me guider sur le droit chemin

...

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier **Madame SATTA Dalila**, directrice de l'équipe de génétique moléculaire avec qui j'ai eu le privilège de bénéficier de ses conseils précieux, sa patience, sa générosité et de son écoute permanente. Je tenais sincèrement à lui assurer toute mon admiration.

À **Monsieur le Professeur BENHIZIA Yacine**, qui nous a fait l'honneur et le plaisir d'accepter de présider la soutenance de cette thèse. Recevez le témoignage de ma profonde reconnaissance.

À **Madame SEKHRI-ARAF A Nedjouda**, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur et de l'intérêt qu'elle porte à ce travail. Je tenais à lui assurer tout mon respect.

À **Madame DEKKICHE Samia**, pour intérêt accordé à ce travail et du privilège de le lui présenter. Un grand merci.

À **Monsieur REZOUGOUN Mohamed Larbi**, pour sa gentillesse, son soutien, sa présence, son efficacité et sa ténacité à toutes épreuves. Son encadrement sans failles me laissera à jamais un souvenir des plus agréables et un modèle à suivre.

À **Monsieur BOUCHEHAM Anouar**, qui est apparu comme une lanterne au fond d'un puits aux moments les plus sombres, et qui s'est avéré être une boussole, un guide et un confident. Un merci ne suffira jamais pour exprimer ma gratitude.

Merci au **Professeur Nicholas BARNICH**, de m'avoir accepté au sein de son unité de recherche M2iSH et de la confiance qu'il m'a accordée. Son accueil, sa bienveillance ainsi que sa gentillesse et celle de toute l'équipe ; Jeannette, Caroline, Virginie, Adeline, Alexandra, Jérémy, Gwen... et tous les autres avec qui j'ai partagé l'un des moments les plus agréables de ma thèse.

Au professeur **BENLABED Kaddour** ainsi que toute l'équipe du service de Microbiologie du CHU Benbadis Constantine, un grand merci pour l'aide apportée à la réalisation de ce travail.

Je remercie tout particulièrement le **Docteur BOUROUIED Youcef**, qui a été un guide, un mentor et qui a toujours été présent dans tous les moments. Son optimisme aura été une bouffée d'air frais.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent également, à toutes les personnes de l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, avec qui j'ai passé de bons moments.

Dédicaces

À mes très chers parents ; *FATIMA ZOHRRA* et *MUSTAPHA*.

Merci de faire en sorte que je ne manque de rien. De m'aider pour tout, depuis que je suis née, jusqu'à aujourd'hui. De croire en moi et de m'avoir appris à surmonter mes peurs. D'être le parfait exemple d'efforts et de sacrifices et merci d'être les meilleurs parents qu'une fille puisse avoir. Un chaleureux merci pour toutes les merveilleuses choses que vous avez faites pour moi au fil des ans, je vous en serai à jamais reconnaissante.

Merci pour tout, tout simplement.

Aux membres de ma famille qui m'ont soutenu dans tous les instants :

À ma sœur *ADRA*

À mon frère *CHEMSEDDINE*

À mon beau-frère *ABDOU*

À ma belle-sœur *SARA*

À mes neuves et nièces ; *MERIHENE, FADI, LYNE, MAZEN*

Enfin, à la prunelle de mes yeux, à la lumière de ma vie, à ma joie de tous les instants, à ma raison de vivre, ma fierté, ma fille bien-aimée *MAYACINE*. Ceci est pour toi.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

afa : Afimbrial Adhesins

AIEC : *E. coli* Adhérents Invasives

ast : EAEC Heat-Stable Enterotoxin1 (EAST-1)

AT : Annealing Temperature

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme-Société Française de Microbiologie

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CoEC: *E. coli* Commensales

DAEC : *E. coli* à Adhérence Diffuse

DEC : *E. coli* Diarrhéiques

dNTPs : Désoxyribonucléotide triphosphate

E. coli : *Escherichia coli*

eaeA : Intimin

EAEC ou EA~~g~~EC : *E. coli* entéroaggrégatifs

ECBU : Examen cytobactériologique des urines

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques

EIEC : *E. coli* entéro-invasifs

EPEC : *E. coli* entéro-pathogènes

ETEC : *E. coli* entérotoxinogènes

ExPEC : *E. coli* Pathogènes Extra-intestinales

FVs : Facteurs de Virulence

GLASS : Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens

GN : Gélose nutritive

HGT : Transfert horizontal des gènes

hlyA : Hemolysin

HyPEC : *E. coli* Hybrides

InPEC : *E. coli* Pathogènes Intestinaux

invE : Regulator for Cell Invasion

ITUs : Infection du Tractus Urinaire

Kb : Kilo Base

MDR : Multidrug Resistant

MLEE : Multi Locus Enzyme Electrophoresis

MLST : Multi Loci Sequence Typing

NMEC : *E. coli* pathogènes associées à la Méningite Néonatale

No: Number

ONPG : O-Nitrophényl- β -D-galactopyranoside

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAIs : Ilots de Pathogénicité

pap : pili associated with pyelonephritis

Pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR-RFLP : PCR-restriction fragment length polymorphism

RM : Rouge de méthyle

SEPEC : *E. coli* Pathogènes associées à la Septicémie

STI : Heat-Stable Enterotoxin

STEC : *E. coli* productrices de Shiga toxines

Stx1 : Shigatoxin 1

Stx2 : Shigatoxin 2

TDA : Tryptophane Désaminase

TSI : Triple Sugar Iron Agar

UPEC : *E. coli* uropathogènes

VP : Voges Prauskauer

Table des matières

Introduction.....	01
-------------------	----

Partie I : revue bibliographique

Chapitre 1 : généralité

1. Historique.....	04
2. Taxonomie.....	04
2.1. Taxonomie et nomenclature.....	04
2.2. Principe de classification.....	04
3. Habitat et niche écologique d' <i>Escherichia coli</i>	05
4. Caractères bactériologiques d' <i>Escherichia coli</i>	06
5.1. Caractères morphologiques.....	06
5.2. Caractères cultureux.....	07
5.3. Caractères biochimiques.....	07
5.4. Caractères antigéniques.....	08
5. Résistance bactérienne.....	09
5.1. Les types de résistances bactériennes.....	09
5.1.1. Résistance naturelle.....	10
5.1.2. Résistance acquise.....	10
5.2. Supports génétiques de la résistance.....	10
5.3. Résistance actuelle à <i>E. coli</i>	12

Chapitre 2 : phylogénie d'*Escherichia coli*

1. Phylogénie et phylogroupes.....	14
2. Approche et intérêt de la phylogénétique.....	14
3. Paradoxe des transferts horizontaux en phylogénétique.....	15
4. Phylogénétique moléculaire.....	16
4.1. Datations moléculaires.....	16
4.2. Choix et obtention des caractères.....	17
5. Histoire de la phylogénie d' <i>Escherichia coli</i>	17

6. Diversité phylogénétique d' <i>Escherichia coli</i>	18
7. Plasticité génotypique et clonalité d' <i>Escherichia coli</i>	21

Chapitre 3 : pathogénicité d'*Escherichia coli*

1. Commensalité et pathogénicité.....	23
2. Notions de Pathotypes ou Pathovars.....	23
3. Émergence de la virulence et évolution des diverses pathogènes d' <i>E. coli</i>	24
4. Les <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux (InPEC) ou diarrhéiques (DEC).....	25
4.1. <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC).....	25
4.2. <i>E. coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	25
4.3. <i>E. coli</i> entéroinvasives (EIEC).....	26
4.4. <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC).....	26
4.5. <i>E. coli</i> à adhésion diffuse (DAEC).....	26
4.6. <i>E. coli</i> entéroagréatives (EAggEC).....	27
4.7. <i>E. coli</i> adhérents invasives (AIEC).....	27
5. <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux (ExPEC).....	28
5.1. <i>E. coli</i> uropathogènes (UPEC).....	29
5.2. <i>E. coli</i> pathogènes associées à la méningite néonatale (NMEC).....	29
5.3. <i>E. coli</i> pathogènes associées à la septicémie (SEPEC).....	30
6. <i>E. coli</i> pathogènes hybrides (HyPEC).....	31

Partie II : Matériel et Méthodes

1. Patients et méthode.....	33
1.1. Paramètres cliniques.....	33
1.1.1. Source du prélèvement biologique.....	33
1.1.2. Nature du prélèvement biologique.....	33
1.1.3. Âge des patients.....	33
1.1.4. Sexe des patients.....	33
1.2. Devenir des prélèvements biologiques.....	34
2. Traitement des prélèvements.....	34
2.1. Examen cyto bactériologique des urines.....	34
2.2. Analyse bactériologique.....	35

2.2.1. Identification des caractères cultureux.....	35
2.2.2. Caractérisation biochimique.....	35
2.2.2.1. Étude du métabolisme glucidique.....	35
2.2.2.2. Étude du métabolisme protéique.....	37
2.2.3. Détermination de la résistance aux antibiotiques (antibiogramme).....	38
2.2.4. Méthodes de conservation.....	39
2.3. Étude moléculaire.....	39
2.3.1. Extraction de l'ADN.....	40
2.3.2. Analyse phylogénétique.....	40
2.3.3. Criblage des facteurs de virulence.....	42
3. Étude statistique.....	45

Partie III : Résultats

1. Prélèvements obtenus.....	46
1.1. Source du prélèvement biologique.....	47
1.2. Nature du prélèvement biologique.....	47
2. Paramètres cliniques.....	47
2.1. Âge du patient.....	47
2.2. Sexe du patient.....	48
3. Analyse bactériologique.....	48
3.1. Identification des <i>E. coli</i>	48
3.2. Caractérisation biochimique.....	49
4. <i>Escherichia coli</i> issues d'infections urinaires.....	50
4.1. Paramètres cliniques.....	50
4.1.1. Âge du patient.....	50
4.1.2. Sexe du patient.....	50
4.2. Examen cyto bactériologique.....	51
4.3. Détermination de la résistance aux antibiotiques (antibiogramme).....	51
4.4. Étude moléculaire.....	53
4.4.1. Profil phylogénétique.....	53
4.4.2. Prévalence des gènes de virulence.....	54
4.4.3. Prévalence des gènes de virulence chez les patients ambulatoires et hospitalisés.....	55
4.4.4. Profile phénotypique des gènes de virulence.....	55
4.4.5. Distribution des gènes de virulence en fonction du groupe phylogénétique.....	56

4.4.6. Détection d'hybride ExPEC/InPEC obtenus à partir de patients atteints d'infections urinaires.....	57
5. <i>Escherichia coli</i> issues de diverses infections extra-intestinales.....	59
5.1. Paramètres cliniques.....	59
5.1.1. Âge du patient.....	59
5.1.2. Sexe du patient.....	59
5.2. Détermination de la résistance aux antibiotiques (antibiogramme).....	60
5.3. Étude moléculaire.....	61
5.3.1. Profil phylogénétique.....	61
5.3.2. Prévalence des gènes de virulence.....	62
5.3.3. Prévalence des gènes de virulence chez les patients ambulatoires et hospitalisés.....	63
5.3.4. Profile phénotypique des gènes de virulence.....	63
5.3.5. Distribution des gènes de virulence dans les groupes phylogénétiques.....	65
5.3.6. Détection d'hybride ExPEC/InPEC obtenus à partir de patients atteints de diverses infections extra-intestinales.....	67

Partie IV : Discussion

Discussion.....	68
Conclusion et perspectives.....	75
Références bibliographiques.....	77
Annexes.....	93

Liste des figures

Figure 01 :	<i>Escherichia coli</i>	07
02 :	Cluster des gènes de l'antigène O (<i>rfb</i>)	08
03 :	Structure moléculaire d' <i>Escherichia coli</i>	09
04 :	Exemple de la carte du transposon Tn21	11
05 :	Organisation générale d'un intégron	12
06 :	Représentation de l'arbre phylogénétique universel de Woese	15
07 :	Diversité phylogénétique d' <i>Escherichia coli</i>	19
08 :	Arbre phylogénétique représentant <i>E. coli</i> d'une souche de <i>E. fergusonii</i>	20
09 :	Représentation de la composition et de la plasticité génomique d' <i>E. coli</i>	22
10 :	Mécanismes d'acquisition et de délétion de gènes chez <i>E. coli</i> appartenant aux différents pathovars	24
11 :	Pathogénie associée aux classes de <i>E. coli</i> responsables de diarrhées	28
12 :	Sites de colonisation des différents groupes d' <i>E. coli</i> pathogènes	30
13 :	Nombres de prélèvements obtenus par service	46
14 :	Répartition des souches d' <i>E. coli</i> isolées selon la nature biologique du prélèvement	47
15 :	Histogramme représentant la répartition des patients par tranche d'âge	47
16 :	Répartition des souches d' <i>E. coli</i> isolées en fonction du sexe des patients.	48
17 :	Aspect des colonies d' <i>E. coli</i> sur milieu Hektoen	48
18 :	Répartition des souches d' <i>E. coli</i> isolées d'infections urinaires en fonction du sexe des patients	50
19 :	Distribution des groupes d'âge et du sexe des patients atteints d'infections urinaires	50
20 :	Histogramme des profils de résistance aux antibiotiques des isolats d' <i>E. coli</i> provenant de patients atteints d'infection urinaire	51
21 :	Répartition des groupes phylogénétiques des souches <i>E. coli</i> issues d'infections urinaires	53

22 :	Profils des phylogroupes sur électrophorèse sur gel d'agarose des souches 1 à 12 étudiées	53
23 :	Histogramme représentant la prévalence des gènes de virulence des <i>E. coli</i> issues d'infections urinaires	54
24 :	Histogramme représentant la répartition des patients atteints de différentes infections par tranche d'âge	59
25 :	Répartition des souches d' <i>E. coli</i> isolées de différentes infections en fonction du sexe des patients	59
26 :	Histogramme des profils de résistance aux antibiotiques des isolats d' <i>E. coli</i> provenant de patients atteints de différentes infections	61
27 :	Répartition des groupes phylogénétiques des souches <i>E. coli</i> issues de différentes infections extra-intestinales	61
28 :	Histogramme représentant la prévalence des gènes de virulence des <i>E. coli</i> issues de différentes infections extra-intestinales	62

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Quelques caractères biochimiques des entérobactéries	08
02 :	Caractéristiques résumées des hybrides et des hétéropathogènes	32
03 :	Liste des antibiotiques testés et les familles d'antibiotiques correspondantes	38
04 :	Caractéristiques des amorces utilisées pour la détermination du phylogroupe	41
05 :	Composition du milieu réactionnel de PCR Quadruplex et la PCR Duplex.	41
06 :	Composition du milieu réactionnel de PCR Simplex.	42
07 :	Programme du thermocycleur pour l'amplification des gènes de phylogroupage.	42
08 :	Caractéristiques des amorces utilisées pour la détermination du profil de génétique de virulence	43
09 :	Composition du milieu réactionnel de PCR pour la détermination du profil de génétique de virulence.	44
10 :	Programme du thermocycleur pour l'amplification des gènes de virulence prospectés	44
11 :	Réactions attendues des différents milieux utilisés pour l'identification biochimique d' <i>Escherichia coli</i>	49
12 :	Profils de résistance aux antibiotiques des isolats d' <i>E. coli</i> provenant de patients atteints d'infection urinaire	52
13 :	Prévalence des gènes de virulence des <i>E. coli</i> issues d'infections urinaires	54
14 :	Prévalence des gènes de virulence de <i>E. coli</i> issues d'infections urinaires chez les patients hospitalisés et ambulatoires	55
15 :	Profil phénotypique des gènes de virulence des <i>E. coli</i> issues d'infections urinaires	56
16 :	Répartition des groupes phylogénétiques avec au moins un gène de virulence	57
17 :	Association entre les gènes de virulence et les groupes phylogénétiques	58
18 :	Souches hybrides ExPEC/InPEC obtenues à partir de patients atteints d'infections urinaires	57

19 :	Profils de résistance aux antibiotiques des isolats d' <i>E. coli</i> provenant de patients atteints de différentes infections	60
20 :	Prévalence des gènes de virulence des <i>E. coli</i> issues de différentes infections extra-intestinales	62
21 :	Prévalence des gènes de virulence de <i>E. coli</i> issues de différentes infections extra-intestinales chez les patients hospitalisés et ambulatoires	63
22 :	Profils phénotypiques des gènes de virulence des <i>E. coli</i> issues de différentes infections extra-intestinales	64
23 :	Association entre les gènes de virulence et les divers prélèvements cliniques.	65
24 :	Association entre les gènes de virulence et les groupes phylogénétiques de souches d' <i>E. coli</i> issues de diverses infections extra-intestinales	66
25 :	Souches hybrides ExPEC/InPEC obtenues à partir de patients atteints de diverses infections extra-intestinales	67

Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) est un pathogène commensal, opportuniste que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal humain et de nombreux animaux, c'est souvent l'une des premières bactéries à coloniser le tube digestif des nouveau-nés et persiste tout au long de leur vie (Desvaux *et al.*, 2020). Cependant, il existe plusieurs *E. coli* hautement adaptés qui ont acquis de nombreux gènes de virulence leur conférant une capacité accrue à coloniser de nouvelles niches, entraînant des infections intestinales et extra-intestinales. Leur gravité est aussi très variable, allant d'une infection bénigne à des infections potentiellement mortelles. Les facteurs de virulence (FVs) sont fréquemment codés sur des éléments génétiques qui peuvent être mobilisés dans différentes souches pour créer de nouvelles combinaisons de marqueurs de virulence, ou sur des éléments génétiques qui auraient pu être mobiles autrefois, mais qui ont maintenant évolué pour devenir « verrouillés » dans le génome (Croxen et Finlay, 2010 ; Denamur *et al.*, 2021).

Selon leurs sites d'existence, les *E. coli* pathogènes sont la cause de diarrhées qui peuvent être sanglantes pour les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) ou *E. coli* diarrhéiques (DEC) ainsi que d'infections dans divers organes pour les *E. coli* extra-intestinaux (ExPEC). Les DEC comprennent 6 pathovars reconnus par des facteurs de virulence spécifiques, tels que ; *E. coli* entérotoxigène (ETEC), *E. coli* entéro-pathogène (EPEC), *E. coli* entérohémorragique (EHEC/STEC) producteur de shigatoxines, *E. coli* entéroaggrégatif (EAEC), *E. coli* entéro-invasif (EIEC), *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et *E. coli* adhérents invasives (AIEC). Le terme *E. coli* pathogène extra-intestinal (ExPEC) désigne des souches d'*E. coli* capables de provoquer des infections extra-intestinales, telles que bactériémie, méningite, infections des voies urinaires, pneumonie et autres infections des tissus mous et qui sont initialement, des habitants de l'intestin avec des gènes de virulence différents des souches InPEC ou d'*E. coli* commensales (CoEC) (Rojas-Lopez *et al.*, 2018 ; Manges *et al.*, 2019).

Parmi les ExPEC, les souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC) sont le plus souvent associées à des maladies humaines et sont la principale cause d'infections du tractus urinaire (ITUs) représentant 80% des cas. Chacun des pathotypes d'ExPEC possède des facteurs de virulence qui, combinés, sont responsables de leur pathogénicité provoquant l'infection (Ulett *et al.*, 2013 ; Subashchandrabose et Mobley, 2015).

La grande plasticité génétique du génome d'*E. coli* et le transfert horizontal efficace de gènes aux niveaux plasmiques et chromosomiques confèrent aux bactéries un grand pouvoir évolutif. Cet échange constant et efficace de fractions génomiques permet l'acquisition de gènes de résistance et de virulence ce qui conduit à l'émergence de nouveaux pathotypes (Denamur *et al.*, 2021). Ainsi, de nouvelles souches hybrides (HyPEC) sont apparues ces dernières années. En fait, les souches hybrides pathogènes d'*E. coli* comprennent une combinaison de facteurs de virulence d'InPEC et d'ExPEC en même temps et ont la capacité de provoquer des infections intestinales et extra-intestinales. Elles sont donc considérées comme plus virulentes (Nascimento *et al.*, 2022).

Actuellement, l'antibiothérapie est la stratégie thérapeutique la plus utilisée contre les infections urinaires ainsi que toute autre infection à *E. coli*. Néanmoins, les traitements répétés aux antibiotiques pour les différentes infections et leur utilisation anarchique entraînent une augmentation inquiétante de la résistance aux antibiotiques. En plus de cet effet, ces changements affectent négativement le microbiote commensal intestinal des patients conduisant à des infections secondaires après le traitement (Becattini *et al.*, 2016 ; Braz *et al.*, 2020).

Pour ces raisons, il est nécessaire d'établir des stratégies thérapeutiques alternatives. L'une des stratégies en cours d'étude est l'amélioration de la prise en charge des infections urinaires en ciblant les voies de pathogénicité des UPEC par le développement de vaccins préventifs, afin de générer une forte réponse immunitaire des muqueuses des voies urinaires (Rojas-Lopez *et al.*, 2018 ; Loubet *et al.*, 2020). Ceci est rendu difficile en raison de la nature hétérogène des *E. coli*. Le principe de ciblage des voies de virulence permettra de neutraliser la capacité des agents pathogènes à provoquer des maladies et cela sans altérer le microbiote. De fait, les traitements antiviraux s'attaquent aux processus impliqués dans la pathogenèse alors que les mécanismes de croissance et de multiplication bactériennes sont les cibles des antibiotiques conventionnels. Pour pallier à ce problème, le vaccin devra cibler plusieurs antigènes, car toutes les souches d'*E. coli* n'expriment pas les mêmes gènes de virulence au cours des infections. Sur cette base, un vaccin ciblant plusieurs facteurs de virulence pourrait être cliniquement efficace contre les infections urinaires (Mainil, 2013).

Dans ce contexte, le but de cette étude est de :

- Déterminer la distribution des FVs des *E. coli* issus de patients algériens atteints d'infections urinaires afin de cibler les marqueurs de virulence les plus souvent exprimés, et qui pourraient faire partie du panel d'un éventuel vaccin. En outre, l'identification des groupes phylogénétiques permettra de classer les souches *E. coli* étudiées et aidera à mieux cerner leurs pouvoirs pathogènes, ainsi qu'à la compréhension de la relation entre les phylogroupes et les FVs.
- Déterminer la distribution des mêmes FVs d'*E. coli* issues de patients atteints de différentes infections extra-intestinales dans le but de comparer les données obtenues à ceux des infections urinaires ; les résultats contribueront à orienter les recherches sur la possibilité de concevoir un traitement universel englobant différentes infections et ainsi cibler un large éventail d'*E. coli* pathogènes.
- Identifier la présence de nouvelles souches hybrides (HyPEC) à l'aide du panel de gènes de virulence prospecté. Ce dernier souligne l'implication de FVs typiques aux ExPEC ainsi que d'autres qui sont généralement associés aux InPEC. Cette perspective permettra de déterminer leurs propriétés phénotypiques et génotypiques pour mieux évaluer leurs potentiels pathogènes.

*Revue
bibliographique*

Chapitre 1 : généralités

1. Historique

En 1885, le microbiologiste et pédiatre germano-autrichien Theodor Escherich (1857-1911) entreprit une étude sur les microbes intestinaux du nourrisson et leur rôle dans la digestion et les maladies. Au cours de cette étude, il a découvert une bactérie à croissance rapide qu'il a appelée *Bacterium coli commune*. Ce n'est qu'en 1919 que Castellani et Chalmers proposent le nom d'*Escherichia coli* (*E. coli*) en l'honneur de son découvreur, mais celui-ci n'a été officiellement reconnu qu'en 1958. Théodor Escherich a été le premier à suggérer que des souches d'*E. coli* communes pouvaient également être associées à des infections intestinales ou à des infections du tractus urinaire et le premier isolement de cette bactérie dans un cas d'infection urinaire a été réalisé en 1904 (Shulman et al., 2007 ; Mainil, 2013 ; Marabito, 2014 ; Blount, 2015).

E. coli avait donc tout pour devenir une bactérie modèle en microbiologie, et effectivement, elle a conquis ses lettres de noblesse au milieu du XX^{ème} siècle, rapportant le prix Nobel à Lederberg (1958), Hershey et Luria (1969), Jacob et Monod (1965) (Sensen, 2008).

2. Taxonomie

2.1. Taxonomie et nomenclature

Le but de la classification (taxonomie) est d'attribuer une identité au type de bactérie isolée. Comme dans les autres règnes du monde vivant, les bactéries procaryotes sont classées selon la similitude de leurs caractères (taxons) et sont regroupées en catégories organisées : règne, embranchement, classe, ordre, famille, genre, espèce (Gazengel et Orecchioni, 2013).

2.2. Principe de classification

La classification selon les critères de la taxonomie traditionnelle reposait sur l'analyse phénotypique établie à partir des caractères morphologiques, culturels, biochimiques et physiologiques. Elle est encore utilisée et suffit dans la plupart des cas pour identifier les souches isolées. La méthode de classification actuelle ou taxonomie moléculaire est essentiellement basée sur l'analyse des caractères génotypiques, une recherche indispensable pour révéler l'évolution naturelle des bactéries au cours du temps, ce qui permet de proposer une classification phylogénétique des espèces. Les différents procédés de comparaison des génomes sont :

- La détermination du pourcentage du couple GC dans le génome.
- La détermination du pourcentage d'homologie de séquences par hybridation de brins séparés d'ADN de souches différentes (souches hétérologues).
- L'analyse des séquences nucléotidiques de l'ARNr 16S essentiellement, considéré comme stable, et qui permet le classement des bactéries en groupes phylogénétiques.
- L'analyse de différences fines qui existent dans les génomes de souches bactériennes de la même espèce par des techniques de biologie moléculaire tels que la PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) (Gazengel et Orecchioni, 2013; Lecointre et Le Guyader, 2013).

La classification de Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) fait référence et est utilisée par la majorité des bactériologistes. Cette classification basée sur la comparaison des critères phénotypiques a été révisée depuis 2005 et associe l'analyse des séquences des gènes codant les ARNr 16S (Sobral, 2012 ; Delarras, 2014). Selon la classification de Bergey et les rangs taxonomiques hiérarchiques (Gazengel et Orecchioni, 2013 ; Lecointre et Le Guyader, 2013), *Escherichia coli* appartient aux taxons suivants:

- **Domaine** : *Bactéria*
- **Règne** : *Procaryotae*
- **Embranchement** ou **Phylum** : *Proteobacteria*
- **Classe** : *Gammaproteobacteria*
- **Ordre** : *Enterobacteriales*
- **Famille** : *Enterobacteriaceae*
- **Genre** : *Escherichia*
- **Espèce** : *Escherichia coli*

3. Habitat et niche écologique d'*Escherichia coli*

E. coli, un anaérobie facultatif à Gram négatif, habitant du tube digestif et/ou des fèces des mammifères et même certains animaux à sang-froid (poissons et reptiles). Le microbiote intestinal étant la niche écologique d'*E. coli*, se compose de plus de 500 espèces de bactéries, totalisant 10^{10} à 10^{11} cellules par gramme de contenu du gros intestin. Ainsi bien que les bactéries anaérobies dans l'intestin soient plus nombreuses que *E. coli*

de 100/1 à 10 000/1, *E. coli* est l'organisme aérobique prédominant dans le tractus gastro-intestinal (Tenaillon *et al.*, 2010 ; Touchon *et al.*, 2020).

Jusqu'à relativement récemment, on pensait qu'*E. coli* ne survivait pas bien à l'extérieur de l'hôte, car il était incapable de se répliquer dans les environnements (Winfield et Groisman, 2003). Cependant, des études récentes ont montré que cette bactérie peut survivre pendant de longues périodes en dehors du tractus intestinal et se reproduire dans l'eau, le sol, le sable et les sédiments, dans les climats tropicaux, subtropicaux et tempérés (Ishii et Sadowsky, 2008 ; Berthe *et al.*, 2013 ; Blount, 2015). Ainsi, *E. coli* est souvent utilisé comme indicateur de la pollution fécale de l'eau ; en utilisant des calculs intuitifs, on a estimé que la moitié de sa population réside dans ces habitats secondaires (Tenaillon *et al.*, 2010). Certaines études récentes ont souligné le rôle de ces milieux et ont montré qu'ils pouvaient favoriser la croissance de certaines souches spécifiques. Les génotypes de ces *E. coli* naturalisés étaient distincts des génotypes d'*E. coli* d'origine hôte (Jang *et al.*, 2017).

4. Caractères bactériologiques d'*Escherichia coli*

E. coli exprime les caractères morphologiques, culturels et biochimiques des entérobactéries. C'est un bacille à Gram négatif, polymorphe et mobile (Euzéby, 2005).

4.1. Caractères morphologiques

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif de taille moyenne, soit 1,1 à 1,5 µm de large et 2,0 à 6,0 µm de long. C'est un bacille mobile et pousse sur des milieux ordinaires en 24 heures à 37°C, à pH voisin de la neutralité ; sur gélose, on observe des colonies S (Smooth), lisses, de 1,5 à 3mm de diamètre, arrondies, limitées par un bord régulier, de surface lisse, translucides, plates à centre ombiliqué. On observe également des colonies R (Rough), rugueuses, à bord finement dentelé correspondant généralement à de vieilles souches (figure 01) (Euzéby, 2004 ; Euzéby, 2005 ; Lezzar, 2017).

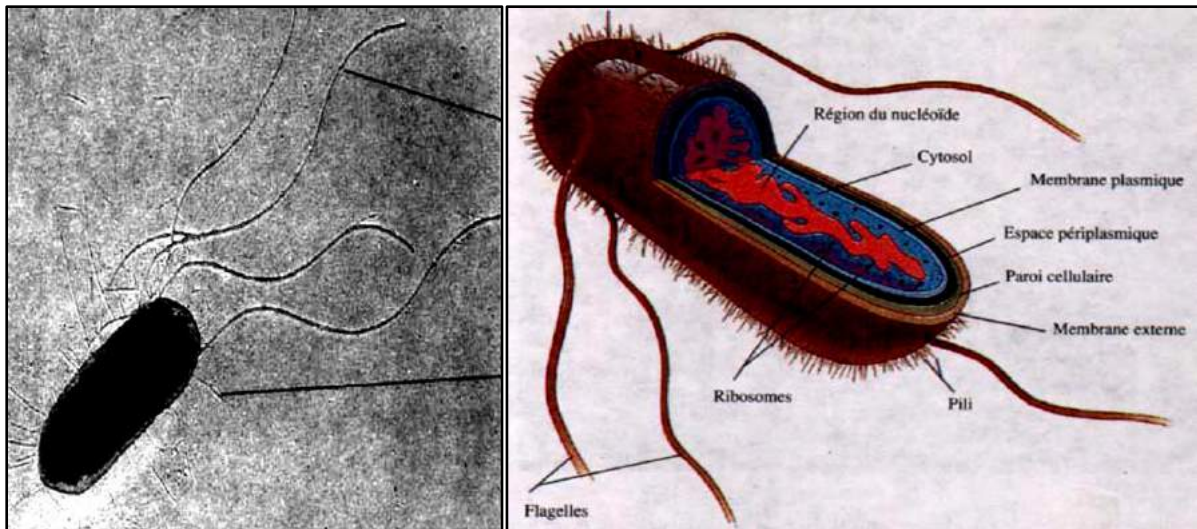


Figure 01. *Escherichia coli* (Horton *et al.*, 1994).

(à gauche : Micrographie électronique d'une cellule de *E. coli* avec ses flagelles (F) et ses pili (P) ; à droite : Ultrastructure de la bactérie *Escherichia coli*)

4.2. Caractères cultureux

Les *E. coli* sont des entérobactéries qui se développent rapidement *in vitro* sur des milieux. La température optimale de croissance est 37°C, mais la culture est possible entre 20° et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes. Sur gélose, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large. L'examen des cultures sur milieux ordinaires ne permet pas, le plus souvent, de distinguer une entérobactérie d'une autre, c'est pourquoi d'autres milieux de culture plus sélectifs s'imposent. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon (Lezzar, 2017).

4.3. Caractères biochimiques

Les caractères d'identification « biochimiques » des *E. coli* sont celles des entérobactéries, utilisant des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane, etc.) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose, etc.), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases, etc.), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz (tableau 01) (Grosjean, 2017 ; Lezzar, 2017).

Tableau 01. Quelques caractères biochimiques des entérobactéries (Euzéby, 2004 ; Lezzar, 2017).

Entérobactéries	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	+/-	+/-	+	+/-
Acétoïne (VP)	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Citrate	-	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Urée	-	-	-	+	-	-	+	-	+
TDA	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H ₂ S	-	+/-	-	-	+	-	+/-	-	-

Symbole (*) : à 20°C. seulement.

4.4. Caractères antigéniques

Le Sérotype est défini par la combinaison des antigènes de surface somatiques O de nature lipopolysaccharidique (LPS), des antigènes capsulaires K de nature polysaccharidique, des antigènes ciliaires ou flagellaires H de nature protéique et des adhésines ou antigènes F (Fimbriaire). Ces derniers sont des composants de surface cellulaires ou annexes des bactéries qui facilitent l'adhérence à d'autres cellules ou à des surfaces inanimées et ont le statut également des facteurs de virulence (Touzeau, 2009 ; Lezzar, 2017).

L'identification des antigènes et sérogroupes a permis de différencier des souches pathogènes des souches commensales. En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment (Diallo, 2013). Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le cluster de gènes *rfb* (figure 02). Ainsi, un typage génétique est possible par amplification puis restriction par l'endonucléase *MboII*, ce qui permet d'obtenir des profils permettant l'identification du sérotype. Ce type d'identification permet en outre une caractérisation plus fine des souches que le sérogroupage classique (Diallo, 2013).

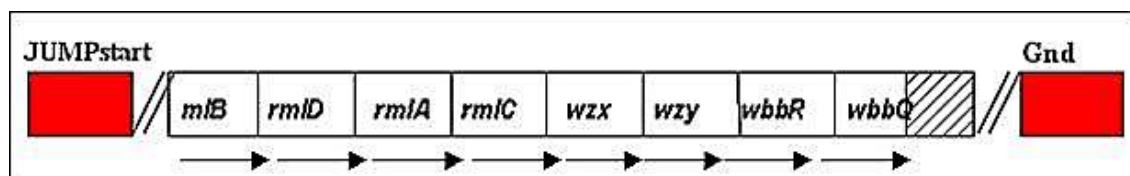


Figure 02. Cluster des gènes de l'antigène O (*rfb*) (AFSSA, 2003).
Gnd = 6-phosphogluconate dehydrogenase, *JUMPstart* = Just Upstream of Many Polysaccharide-associated gene Starts

L'antigène H est codé par le gène *fliC*. Les parties N et C terminales de la flagelline sont très conservés et c'est la partie médiane, plus variable, qui donne la spécificité de l'antigène H (figure 03). Les *E. coli* immobiles possèdent également le gène *fliC* mais sont incapables de synthétiser un flagelle fonctionnel. Après amplification et restriction du gène *fliC*, il est possible de typer l'antigène H en comparant le profil obtenu à une base de données de profil-type (Machado *et al.*, 1998).

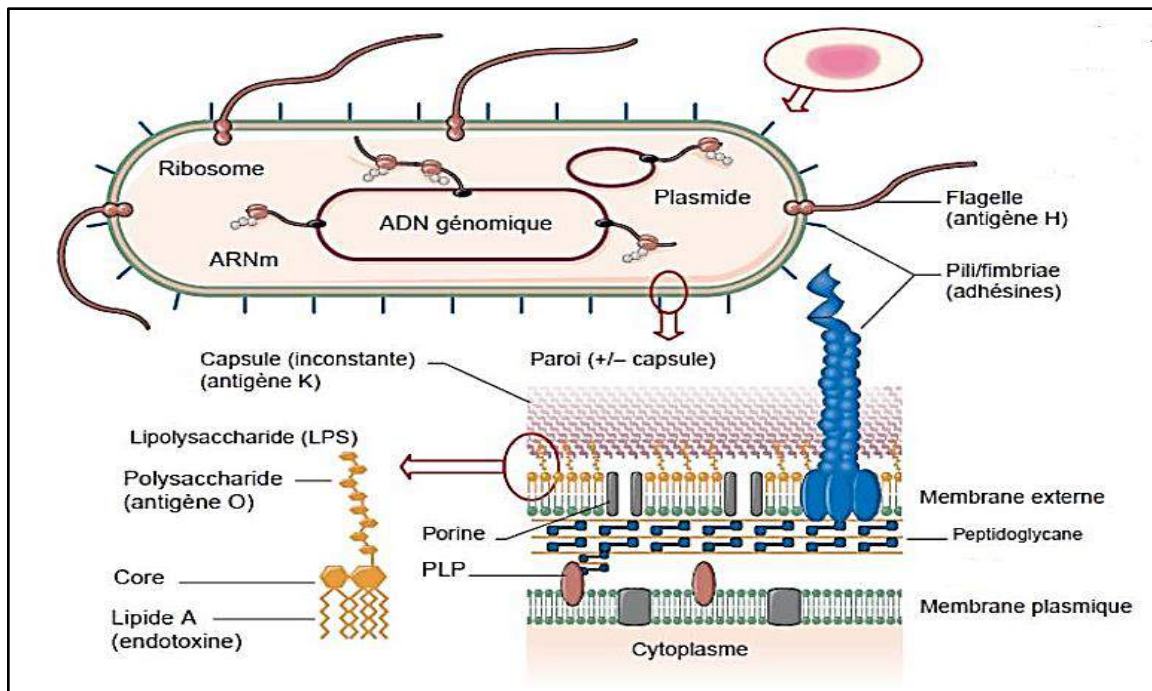


Figure 03. Structure moléculaire d'*Escherichia coli* (Denis *et al.*, 2007).

5. Résistance bactérienne

La résistance bactérienne se définit comme la capacité de continuer à croître ou à survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant (Diallo, 2013).

En outre, d'un point de vue génétique. Une bactérie est dite « résistante » quand elle héberge des gènes codants pour cette résistance, ce qui se traduit comme un changement dans le code génétique du micro-organisme, codant ainsi un gène altéré (Weiss, 2002 ; El abdani, 2016).

5.1. Types de résistances bactériennes

Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance et suivant son caractère inné ou acquis : la résistance naturelle et la résistance acquise.

5.1.1. Résistance naturelle

Les bactéries peuvent présenter une résistance naturelle à certaines familles d'antibiotiques. Ces mécanismes de résistance sont spontanés et assez constants et font donc, partie du patrimoine génétique normal du germe. Ainsi, les antibiotiques sont synthétisés par la plupart des micro-organismes pour supplanter d'autres micro-organismes dans un environnement donné, ces substances peuvent ne pas être actives sur tous les micro-organismes. On dira que ces micro-organismes ont une résistance naturelle vis-à-vis de cette molécule. La résistance naturelle à un antibiotique donné est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce (Bonnet, 2014 ; El abdani, 2016 ; Lezzar, 2017).

5.1.2. Résistance acquise

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Cette modification génétique peut être obtenue soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare, soit par l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger (transformation ou conjugaison des gènes chromosomiques ou plasmidiques), ce qui est plus fréquent. En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gènes, comme par exemple les événements conduisant à l'élargissement du spectre des bêta-lactamases qui leur confèrent une résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases (Alanis, 2005 ; Muylaert et Manil, 2012).

Les causes de ce type de résistance sont multiples, l'utilisation inappropriée ou non modérée d'antibiotiques en est l'une des principales (Dosso *et al.*, 2000 ; OMS, 2014).

5.2. Supports génétiques de la résistance

En plus du chromosome bactérien, des gènes codant la résistance aux antibiotiques sont répartis dans des éléments génétiques mobiles.

- **Le chromosome :** les gènes de résistance codant pour des enzymes d'inactivation ou des systèmes d'échappement s'expriment de façon constitutive lorsqu'ils sont portés par le chromosome conférant les caractères de résistance naturelle de la bactérie. Dans le cas de la résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation, la fréquence de ces mutations est faible et variable (10^{-6} à 10^{-9}), mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler (Diallo, 2013).

- **Les plasmides** : sont à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique. Les plasmides partagent certaines fonctions de partition et quelques recombinaisons spécifiques de site avec le chromosome de l'hôte. Contrairement aux chromosomes, les plasmides ne portent toutefois pas de gènes essentiels à la croissance bactérienne. Ils codent plutôt pour des protéines dont la fonction est de conférer un avantage sélectif comme la résistance aux antibiotiques ou encore des facteurs de virulence (Diallo, 2013 ; Lezzar, 2017).
- **Les transposons** : les transposons de résistance sont des « gènes sauteurs » capables d'incorporer une grande variété de gènes de résistance (figure 04). Les transposons de résistance diffèrent par leur structure, leur proximité génétique, leur mécanisme de transposition et les gènes de résistance qu'ils transportent (Bennett, 2008 ; Um, 2016).

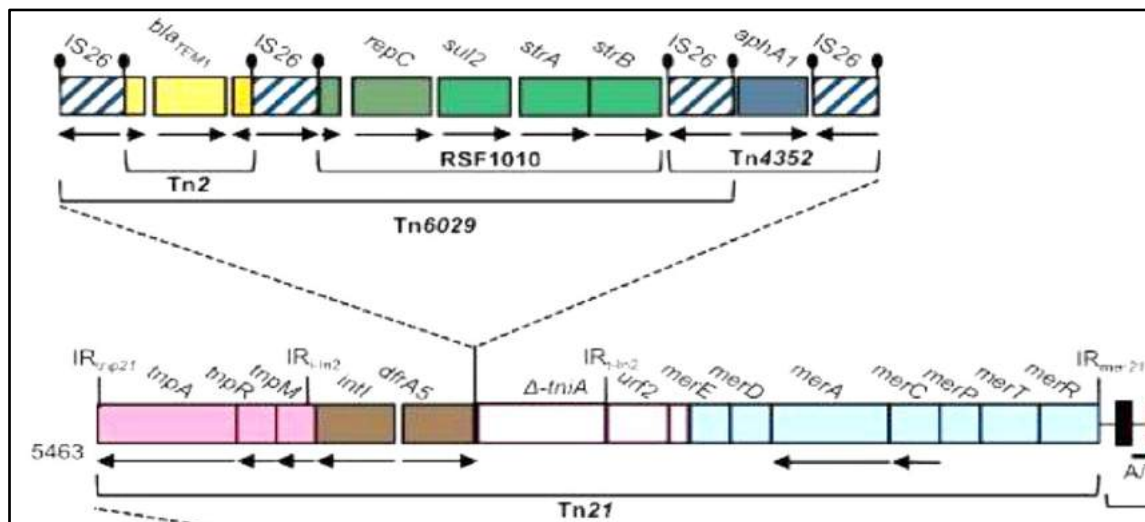


Figure 04. Exemple de la carte du transposon Tn21 porté en copies identiques par le plasmide de virulence des EHEC pO26-CRL₁₁₁ et les plasmides de résistance pO26-CRL₁₂₅ et pO111-CRL₁₁₅ (Venturini *et al.*, 2013).

- **Les intégrons** : sont capables de capturer et exprimer divers gènes de résistance (figure 05). Ils sont souvent encastés sur des transposons ou plasmides ; ce qui, couplé à leur avantage sélectif grâce aux gènes de résistance qui leur sont associés, facilite leur transfert horizontal chez un nombre important d'agents pathogènes (Rowe-Magnus *et al.*, 2002 ; Um, 2016).

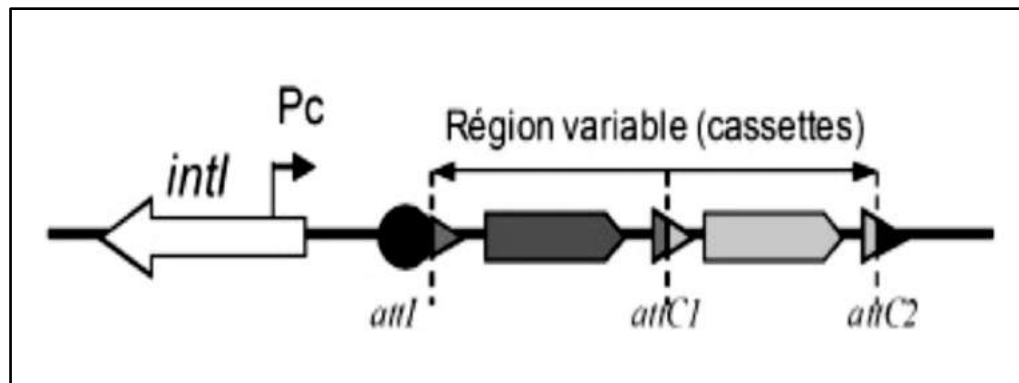


Figure 05 . Organisation générale d'un intégron (Jove *et al.*, 2010).

Un intégron est composé d'une plateforme fonctionnelle avec trois éléments clés : un gène *intI*, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur *Pc*. Une région dite variable, localisée en aval de la plateforme fonctionnelle, renferme un réseau de cassettes. *Pc* : promoteur des cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI* : gène de l'intégrase.

5.3. Résistance actuelle à *E. coli*

L'apparition et la propagation de pathogènes résistants aux médicaments qui ont acquis de nouveaux mécanismes de résistance, conduisant à la résistance aux antimicrobiens, continue à compromettre la capacité à traiter des maladies infectieuses courantes.

En 2019, le rapport de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a entrepris la surveillance de la fréquence des septicémies dues à des pathogènes résistants aux médicaments tels que *E. coli* résistant aux céphalosporines de troisième génération. Cette année-là, 25 pays, territoires et zones ont fourni des données sur les septicémies et 49 pays ont transmis des données sur les septicémies dues à *E. coli*, le taux médian observé pour *E. coli* résistant aux céphalosporines de troisième génération était de 36,0 % (intervalle interquartile : 15,2–63,0).

Le taux de résistance aux ciprofloxacines, un antibiotique fréquemment utilisé pour traiter les infections des voies urinaires, variait de 8,4 % à 92,9 % dans les pays qui participent au Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (GLASS). La résistance d'*E. coli* aux fluoroquinolones utilisés pour traiter les infections des voies urinaires est largement répandue. En effet dans de nombreuses régions du monde, ce traitement est désormais inefficace pour plus de la moitié des patients.

La colistine est l'unique traitement de dernier recours pour des infections potentiellement mortelles dues à des entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella*, etc.) résistantes aux carbapénèmes. On a également détecté des bactéries résistantes à la colistine dans plusieurs pays et régions, à l'origine d'infections pour lesquelles il n'existe actuellement aucun antibiotique efficace (OMS, 2020).

S'appuyant sur les données communiquées par 87 pays en 2020, un nouveau rapport de l'OMS met en évidence des niveaux élevés de résistance pour les bactéries, ce qui donne lieu à des infections sanguines potentiellement mortelles, ainsi qu'une progression de la résistance au traitement de plusieurs bactéries responsables d'infections courantes dans la population. En effet, plus de 20 % des isolats d'*E. coli*, l'agent pathogène le plus courant dans les infections des voies urinaires étaient résistants à la fois aux médicaments de première intention (ampicilline et cotrimoxazole) et au traitement de deuxième intention (fluoroquinolones) (OMS, 2022).

Chapitre 2 : phylogénie d'*Escherichia coli*

1. Phylogénétique et phylogroupes

Le terme « phylogénétique » dérivé des termes grecs *phyle* et *phylon* signifie « tribu » et « race » ; et le terme *genetikos*, de genèse c'est-à-dire « naissance » (Roy *et al.*, 2014). La classification phylogénétique est l'étude des liens génétiques entre divers organismes. Ces relations permettent d'établir un contexte pour examiner la signification historique du développement et l'évolution du génome des espèces. Ainsi, les phylogroupes sont définies comme étant la classification des individus en groupes selon l'identification de critères moléculaires communs (Oren, 2010 ; Branchu, 2012 ; Balière, 2016).

2. Approche et intérêt de la phylogénétique

Traditionnellement, la phylogénétique a été construite en utilisant uniquement des données morphologiques. L'introduction du séquençage Sanger et de la PCR à la fin des années 1970 a permis d'intégrer des informations génétiques dans les analyses phylogénétiques. C'est au milieu des années 2000, que de nouvelles techniques de séquençage ont été développées, ce qui a révolutionné la phylogénie, en augmentant la vitesse et la quantité de données des séquences génomiques. Ce développement a transformé le domaine de la phylogénétique moléculaire en phylogénomique (Young et Gillung, 2020). Les études phylogénétiques ont conduit les scientifiques à la construction d'arbres phylogénétiques. Leur schématisation repose sur le principe de parcimonie qui privilégie la séquence avec le minimum de changements évolutifs pour expliquer des relations phylogéniques. Ainsi, l'hypothèse de phylogénie privilégiée est celle qui représente le plus d'homologie (similitude due à une ascendance commune). L'arbre se lie de bas (tronc) en haut (feuilles), ce qui correspond à la séquence de spéciation au sein d'un groupe. C'est la façon la plus adéquate d'illustrer les relations de parenté entre taxons en deux dimensions (figure 06). Dans ce cadre, l'arbre permet à la fois l'introduction d'une dimension temporelle et d'une représentation graphique de la distribution des caractères parmi les taxons (Tassy, 1992 ; Richard *et al.*, 2014).

La phylogénétique est devenue au cours des années une étude importante. Elle permet de collecter des informations sur la diversité biologique, les classifications génétiques, ainsi que l'évolution des gènes, des génomes, des espèces. Non seulement cette étude renseigne sur l'évolution des séquences moléculaires, mais aussi permet de prédire les éventuels changements à venir (Martiny *et al.*, 2015).

Les nouvelles techniques de séquençage moléculaire ainsi que les approches phylogénétiques peuvent être utilisées pour identifier l'origine de nouveaux agents pathogènes. Ces informations permettent d'aider les chercheurs à la compréhension de nouvelles épidémies de pathogènes. Cela englobe la découverte de l'espèce à laquelle l'agent pathogène est lié, ensuite, déterminer la source probable de transmission, ce qui peut conduire à de nouvelles recommandations de santé publique (Martiny *et al.*, 2015).

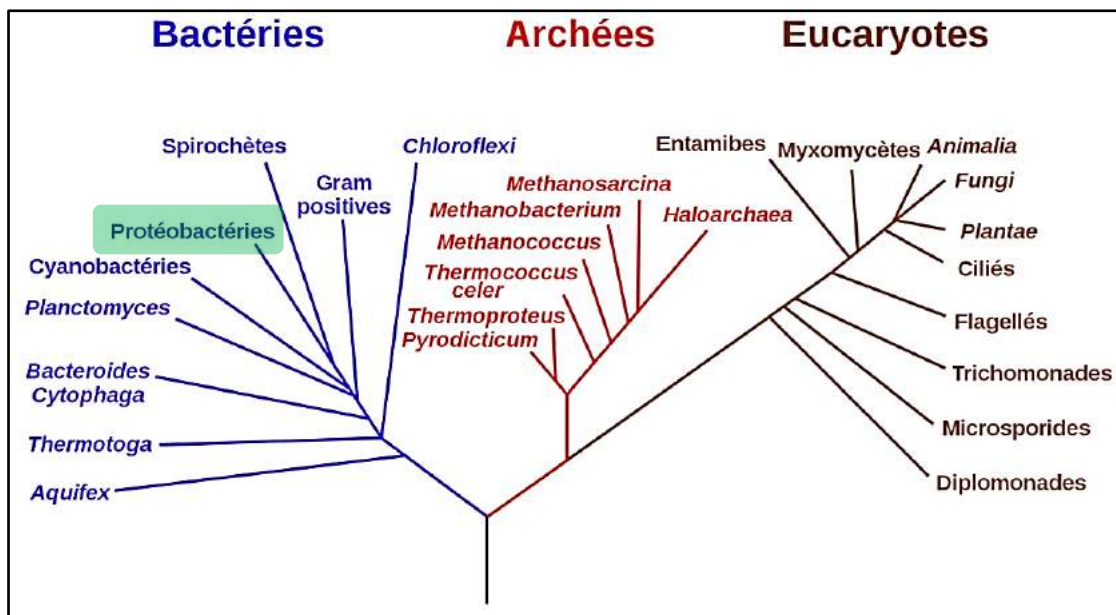


Figure 06. Représentation de l'arbre phylogénétique universel de Woese (Woese *et al.*, 1990).

3. Paradoxe des transferts horizontaux en phylogénétique

La première description d'un transfert horizontal de gènes (HGT) par Griffith (1928) a été une avancée majeure en biologie moléculaire en démontrant qu'il existe un principe permettant l'acquisition de nouveaux gènes venant d'un organisme autre qu'une cellule parentale, et ainsi capable de modifier l'hérédité. Ce principe repose sur trois mécanismes : la conjugaison, la transduction et la transformation (Daubin et Szöllösi, 2016). Le transfert horizontal de gènes est une force majeure alimentant l'évolution procaryote. Le HGT est omniprésent et permet à des organismes taxonomiquement différents de partager un pool génétique commun, ce qui brouille les frontières entre les clades phylogénétiques distincts et explique pourquoi les procaryotes étroitement apparentés diffèrent grandement en termes de contenu génétique. Autrefois considéré comme un facteur d'erreur important dans la création d'arbres phylogénétiques, l'avènement du séquençage à haut débit

a précisé le véritable rôle évolutif et l'impact que ce processus a eu sur l'évolution de la vie (Rodriguez-Beltran *et al.*, 2021).

Ainsi, au lieu de les écarter, plusieurs chercheurs ont entrepris d'intégrer les HGT dans les études phylogénétiques (Zhaxybayeva et Gogarten, 2004 ; Gogarten et Townsend, 2005 ; Babic *et al.*, 2008). Aujourd'hui, il semble évident que le transfert horizontal est une force importante conduisant l'évolution des Bactéries et des Archées, ainsi que celle des eucaryotes unicellulaires, et doit donc également être considéré comme faisant partie de la structure de toute synthèse évolutive (Goldenfeld et Woese, 2007 ; Boto, 2010).

4. Phylogénétique moléculaire

Précédemment, l'analyse phylogénétique était basée sur la comparaison morphologique entre les organismes et les fossiles, mais les informations obtenues pour les microorganismes étaient limitées, en raison du faible nombre de caractères morphologiques disponibles, mais aussi la quasi-absence de fossiles de procaryotes en comparaison des eucaryotes. Ces lacunes seront en grande partie comblées par l'avènement des techniques de biologie moléculaire et la détermination des séquences nucléotidiques des gènes (Horiike, 2016). La phylogénétique moléculaire est devenue un outil indispensable pour les comparaisons des génomes. Dans ce contexte, elle est utilisée pour classer les séquences métagénomiques ; identifier les gènes, les éléments régulateurs et les ARN non codants dans les génomes nouvellement séquencés ; interpréter les génomes individuels modernes et anciens ; et de reconstruire des génomes ancestraux (Yang et Rannala, 2012). Dans le cadre de l'étude des mécanismes de l'évolution, deux techniques ont principalement facilité l'acquisition, l'analyse et l'interprétation de nouvelles données : les technologies de séquençage et d'analyse du génome ainsi que le traitement informatisé des données (Richard *et al.*, 2014).

4.2. Datations moléculaires

L'incorporation d'un cadre temporel en phylogénie est devenue de plus en plus fréquente ces dernières années. Les datations moléculaires ont ainsi permis de caler la chronologie de différents événements de l'histoire de l'évolution. Le principe des datations moléculaires est simple : il s'agit de convertir des mesures de divergence génétique entre séquences nucléotidiques, en une mesure de temps. Cette méthode passe par trois étapes :

- Procéder à la reconstruction phylogénétique des taxons à partir de données moléculaires, en prenant en compte la longueur des branches.

- À partir des mesures obtenues, l'estimation du temps écoulé en utilisant des points de « calibration » spécifiquement associés aux gènes utilisés au sein du clade.
- Extrapoler les dates connues (calibrées) au reste de l'arbre (Richard *et al.*, 2014).

4.3. Choix et obtention des caractères

Le développement de la biologie moléculaire a permis d'utiliser la description d'acides nucléiques (ADN, ARN) ou de protéines, en tant que caractères permettant de reconstruire les relations de parenté entre espèces et peuvent être ainsi déduites de la comparaison entre ces séquences primaires. Cependant, le choix de ces caractères moléculaire doit être adapté aux critères phylogénétiques recherchés. C'est ainsi que le ciblage et le choix des régions d'ADN stables et à modifications rares permettent d'étudier l'évolution de groupes larges. À l'opposé, le choix des gènes variables, aux variations rapides, est mieux adapté à l'étude de populations au sein d'une même espèce, ou entre espèces proches (Horiike, 2016). Outre l'ADN de gènes stables, d'autres marqueurs sont utilisés pour l'étude d'organismes très distants phylogénétiquement, tels que l'ARN ribosomique (ARNr) 12S et 16S pour les Eubactéries et les Archées, ou 18S et 28S pour les Eucaryotes. Ces marqueurs entrent dans la constitution des ribosomes et représentent des éléments essentiels à l'expression du génome. L'introduction de l'ARNr comme molécule marqueur taxonomique par Woese et Fox a permis d'étendre le paradigme de l'arbre au domaine des micro-organismes (Yang et Rannala, 2012).

À l'heure actuelle, les gènes mitochondriaux et chloroplastiques constituent le type de marqueur le plus utilisé en phylogénétique. En raison de la facilité d'amplifier des portions de gènes due à l'existence de multiples copies du génome mitochondrial (ou chloroplastique), ainsi que la grande variabilité de ses gènes qui évoluent plus rapidement que les gènes nucléaires variables (Gogarten et Townsend, 2005 ; Richard *et al.*, 2014).

5. Histoire de la phylogénie d'*Escherichia coli*

C'est grâce à la méthode MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis) basée sur l'analyse des variantes protéiques, en 1984, Ochman et Selander ont pu réunir plusieurs collections représentatives de l'espèce et ainsi, classifier les souches d'*E. coli* faisant partie de ECOR (*E. coli* Collection Reference). Cette collection de 72 souches d'origines naturelles diverses et issues de différentes parties du monde représente la diversité génétique de l'espèce. Dès lors, cela a permis de générer des quantités substantielles de données comparatives pour de nombreuses souches de l'espèce. Cette technique a permis l'identification de quatre

groupes principaux (A, B1, B2 et D) au sein de la collection ECOR (Ochman et Selander, 1984 ; Clermont *et al.*, 2000 ; Chaudhuri et Henderson, 2012).

C'est durant les années 1990, que MLST (Multi-Locus Sequence Typing) a été élaborée ; une technique alternative au MLEE et plus robuste, ce qui a permis d'affermir les précédents résultats. Cette technique est fondée sur l'étude de la variabilité génétique et sur le principe du typage de séquences dans le but d'identifier les relations clonales entre les bactéries. D'autres techniques basées sur l'ADN total se sont avérées cohérentes, telles que l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD) ou le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (Lecointre *et al.*, 1998).

En 2000, et avec l'arrivée de la PCR, nous avons attribué un phylogroupe à chaque souche en utilisant une combinaison de deux gènes (*chuA* et *yjaA*) et un fragment d'ADN TSPE4.C2 (Clermont *et al.*, 2000), puis en six groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, E, et D), basé sur six gènes (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd*, and *polB*) (Cuevas-Ramos. 2010). C'est en 2013 que la technique de Clermont a été améliorée, notamment grâce à l'utilisation de PCR multiplex (de la triplex à la quadruplex) par l'ajout du gène *arpA*, avec deux PCR allèle-spécifique (pour les phylogroupes C et E). Les ECOR ont été ainsi, classés en 7 groupes phylogénétiques : A, B1, B2, C, D, E et F appartiennent à *E. coli sensu stricto*, le huitième est le clade cryptique I (Clermont *et al.*, 2013 ; Messika, 2017). Récemment, des lignées cryptiques très divergentes au niveau des nucléotides, mais similaires phénotypiquement à *E. coli*, ont été identifiées et nommées *Escherichia* clades I à V (Clermont *et al.*, 2015).

6. Diversité phylogénétique d'*Escherichia coli*

E. coli est l'une des bactéries les plus étudiées. Il a été utilisé comme système modèle dans le développement de la biologie moléculaire. La plupart de ces travaux ont été effectués en utilisant des dérivés de la souche K-12. Cependant, *E. coli* est une bactérie très diversifiée sur un point de vue phylogénétique. Des techniques de plus en plus pointues ont confirmé la diversité ainsi que la répartition des groupes phylogénétiques de l'espèce. Parmi ces techniques, le séquençage à haut débit des génomes WGS (Whole Genome Sequencing), considérée comme plus performante que les techniques de PCR, moins coûteuse, facile à réaliser et fournit une grande quantité de données pour chaque isolat testé. Ainsi, la population de *E. coli* est répartie en quatre phylogroupes considérés comme principaux (A, B1, B2 et D), trois mineurs (C, E et F) et *Escherichia* clade I (Escobar-Paramo *et al.*, 2004 ; Jaureguy *et al.*, 2008 ; Messika, 2017). De nouveaux

sous-phylogroupes (A₀, A₁, B₂, B₂, D₁, D₂) sont apparus et ont permis d'affiner la classification (Smati *et al.*, 2013 ; Balière, 2016).

Les données phylogénétiques ont révélé que le phylogroupe B2 est le plus ancien et le plus diversifié avec au moins dix sous-groupes phylogénétiques observés. De ce fait, pourrait être considérée comme une sous-espèce. Il a été démontré que les 10 sous-groupes présentent une grande diversité génétique dans leur génome variable. Le groupe D forme un groupe « frère » avec B2, les deux sont généralement isolés de sites infectieux extra-intestinaux (infections urinaires, méningites, bactériémies, pneumonies, etc.). De plus, il semblerait que la virulence soit un caractère ancestral. En effet, les groupes B2 et D possèdent un grand nombre de facteurs leur conférant un grand pouvoir de pathogénicité. Le groupe F, initialement inclus dans le groupe D, regroupe des isolats étroitement apparentés aux phylogroupes D et B2. De nos jours, le groupe F est considéré comme l'un des premiers à avoir émergé, suivis par le groupe E (Smati, 2014 ; Messika, 2017 ; Vounba, 2018). Les groupes A, B1 et C apparaissent plus récemment, sont largement prédominants dans l'environnement et dans la flore fécale commensale. Précédemment identifié comme faisant partie du groupe A, le phylogroupe C a été proposé comme un groupe étroitement lié mais distinct du phylogroupe B1 (figures 07 et 08) (Clermont *et al.*, 2013 ; Maris, 2016).

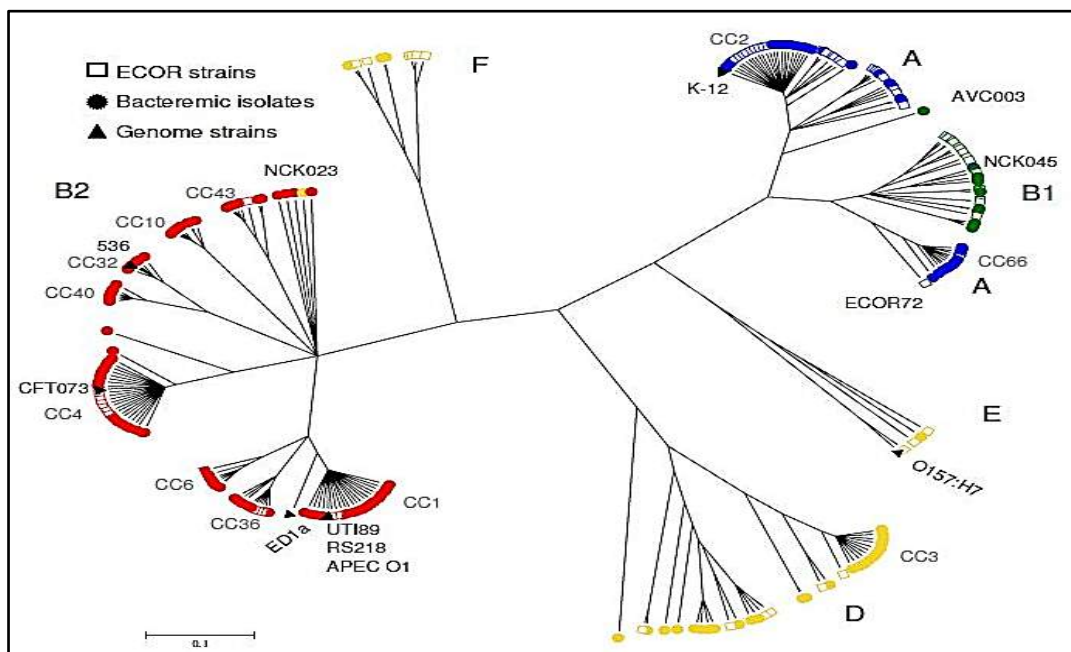


Figure 07. Diversité phylogénétique d'*Escherichia coli* (Jaureguy *et al.*, 2008). 67 souches ECOR (carrés vides) et sept souches de référence du génome (triangles). La couleur des symboles de la souche est conforme au groupement triplex-PCR en principaux groupes phylogénétiques (rouge: B2 ; vert: B1 ; jaune: D ; bleu: A).

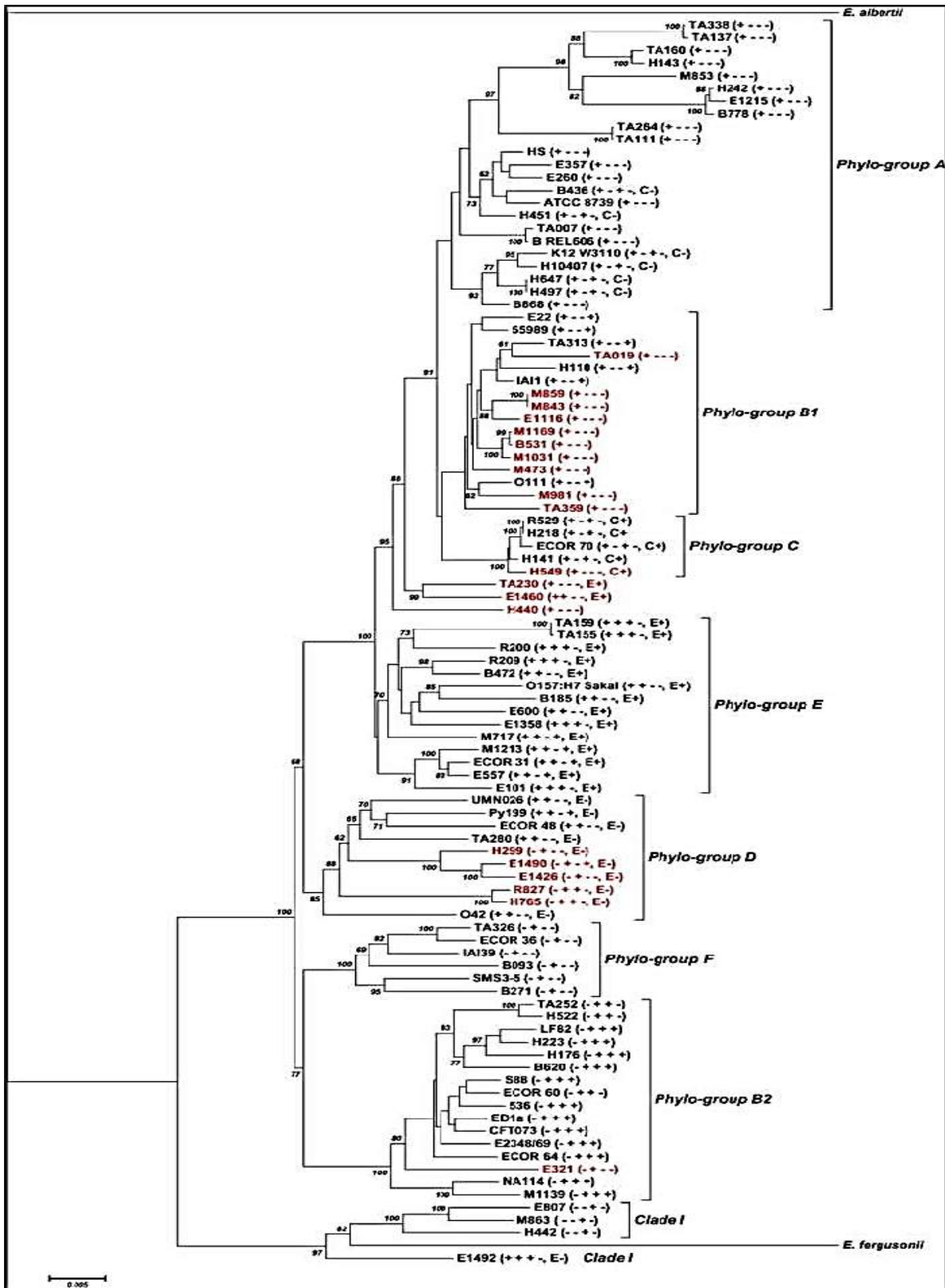


Figure 08. Arbre phylogénétique représentant *E. coli* d'une souche de *E. fergusonii* (Clermont *et al.*, 2013 ; Smati, 2014).

La souche de *E. albertii* a servi pour enraciner l'arbre. Les souches indiquées en rouge correspondent à des souches mal assignées par la nouvelle méthode Clermont quadruplex.

7. Plasticité génotypique et clonalité d'*Escherichia coli*

La plasticité génomique permet aux organismes de s'adapter aux changements environnementaux et d'occuper de nouveaux habitats. Bien que de telles adaptations puissent être observées dans n'importe quel organisme, cela est particulièrement important pour les agents pathogènes qui co-évoluent avec leurs hôtes. *E. coli* est une espèce génétiquement diversifiée comprenant des commensaux intestinaux non pathogènes et des souches pathogènes intestinales et extra-intestinales. Il est reconnu de nos jours, qu'*E. coli* est une espèce versatile au niveau de l'adaptation aux différents hôtes ainsi qu'aux conditions environnementales. Cette versatilité est principalement due au caractère clonal de l'espèce, conduisant au cours de l'évolution, à ce que certaines souches ont divergé et ont donné naissance à de nouvelles lignées de clones. Ces clones sont aujourd'hui à l'origine de l'importante diversité génétique que l'on retrouve au sein de l'espèce (Sabri, 2008 ; Massot *et al.*, 2016). La plasticité du génome d'*E. coli* lui confère un avantage évolutif évident. Outre l'acquisition d'informations génétiques, l'évolution à partir d'ancêtres non pathogènes nécessite une adaptation à un nouvel hôte. Au cours de cette adaptation, les bactéries accumulent des mutations qui augmentent leur fitness, mais peuvent également perdre des gènes dont les produits contrecarrent les traits de virulence (Dobrindt, 2010).

La diversité génétique d'*E. coli* est modulée par recombinaison ou mutation au sein du génome. En effet, la capacité d'évolution par modification du matériel génétique permet de transmettre de nouveaux caractères verticalement aux générations suivantes et ainsi obtenir une large diversité de souches. En outre, l'acquisition d'informations génétiques peut se faire grâce à la conjugaison, la transformation et la transduction. Ces mécanismes permettent l'échange de matériels génétiques entre souches de la même espèce, mais également entre différentes espèces occupant une même niche écologique (Tenaillon *et al.*, 2010).

Le caractère hautement mosaïque du génome d'*E. coli* a été mis en évidence par la comparaison génomique de différentes souches. Les résultats obtenus ont révélé l'existence d'un squelette génomique commun « core genome » et de gènes flexibles acquis. Ces derniers diffèrent entre les souches, permettant l'expression de facteurs de virulence conduisant à des manifestations cliniques plus sévères (Cueva-Ramos, 2010 ; Miquel, 2010). Ainsi, le génome des souches pathogènes de *E. coli* diffère de celui des souches commensales par l'addition de régions supplémentaires qui peuvent représenter jusqu'à 20% de l'information génétique. Le supplément d'information génétique est susceptible de varier, en fonction des souches, dans des proportions allant de 10 à 30% (Vounba, 2018).

À ce jour, le répertoire total de gènes de l'espèce est estimé à 17 838. La majorité des souches, portent environ 4721 gènes, et seulement 1976 gènes appartiennent au fond commun, c'est-à-dire qu'uniquement 11% des gènes connus sont communs à toutes les souches de *E. coli* (Cuevas-Ramos, 2010). Les récents résultats du séquençage génomique et des données de bioinformatique, ont révélé que le nombre de gènes communs à toutes les souches est constant, en revanche celui des gènes propres aux sous-groupes ne cesse d'augmenter (figure 09) (Lezzar, 2017).

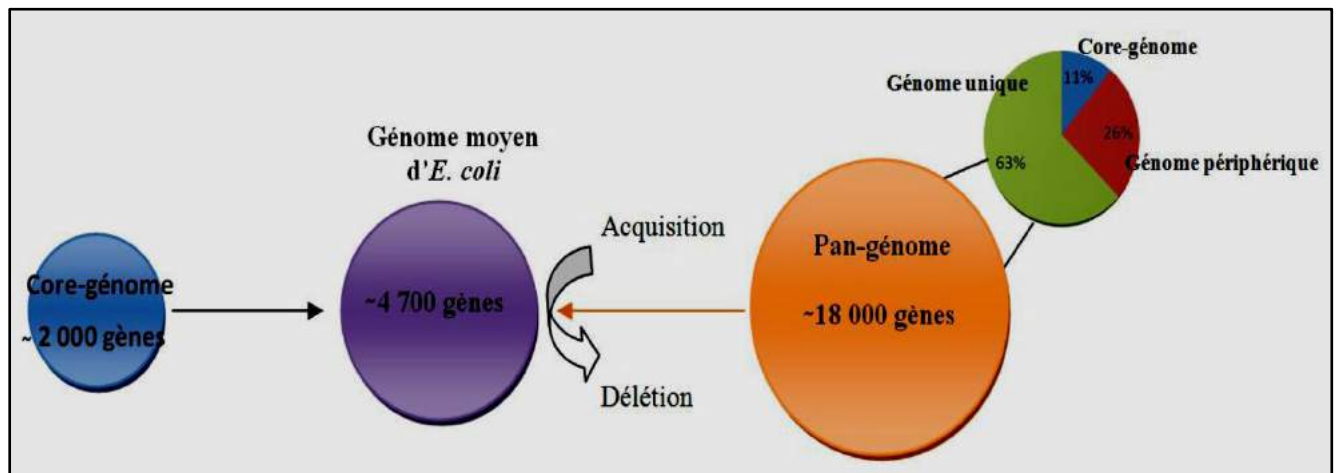


Figure 09. Représentation de la composition et de la plasticité génomique d'*E. coli* (Van-Elsas *et al.*, 2011 ; Balière, 2016).

Chapitre 3 : pathogénicité d'*Escherichia coli*

1. Commensalité et pathogénicité

Les commensaux sont des types de microorganismes résidant sur la surface du corps ou sur les muqueuses, vivant en harmonie avec l'homme et sont principalement constitués de bactéries. Le nombre de bactéries colonisant les surfaces des muqueuses et cutanées dépasse le nombre de cellules formant le corps humain. Les bactéries commensales ont co-évolué avec leurs hôtes. Cependant, dans des conditions spécifiques, elles sont capables de surmonter les réponses protectrices de l'hôte et d'exercer des effets pathologiques. Ainsi, le pouvoir pathogène est la capacité d'un microorganisme à causer une maladie dont les symptômes sont d'intensité variable. La virulence traduit la gravité des troubles engendrés chez l'hôte, ou le degré du pouvoir pathogène (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004). Bien que la plupart des souches *E. coli* puissent être des résidents inoffensifs du tractus gastro-intestinal, ayant le statut de simples commensaux du tube digestif, elles possèdent également la capacité pathogène de provoquer des maladies diarrhéiques et extra-intestinales. Les variantes pathogènes d'*E. coli* (pathotypes) causent beaucoup de morbidité et de mortalité dans le monde. Bien qu'il existe des caractéristiques communes que ces pathotypes utilisent pour coloniser la muqueuse intestinale et provoquer des infections extraintestinales, l'évolution, l'apparition et les complications sont très variables (Croxen et Finlay, 2010).

2. Notion de Pathotypes ou Pathovars

Les *E. coli* pathogènes sont classées en pathotypes (appelés également Pathovars), et sont identifiées à l'aide d'acronymes. Ces pathotypes ont été proposés au fil du temps, au fur et à mesure des découvertes spécifiques et ne sont pas unifiés de manière significative. Leurs définitions sont basées sur différents critères tels que l'organe cible (les voies urinaires pour *E. coli* uropathogènes : UPEC), l'association avec un organe et un hôte (le liquide céphalo-rachidien chez les nouveau-nés pour *E. coli* pathogènes associées à la méningite néonatale : NMEC), l'association avec les organes cibles, la présence de gènes spécifiques ou la virulence dans un modèle animal (*E. coli* pathogène extra-intestinal : ExPEC), la pathologie causée par les souches (diarrhée pour *E. coli* pathogènes diarrhéiques DEC ou intestinaux InPEC), la présence d'un ou plusieurs gènes spécifiques, seuls ou en combinaison (la shigatoxine codée par le gène *stx* pour *E. coli* productrice de shigatoxine STEC) ou un phénotype *ex vivo* spécifique (l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales pour *E. coli* adhérent-invasif AIEC) (Denamur *et al.*, 2021).

3. Émergence de la virulence et évolution des diverses pathogènes d'*E. coli*

L'évolution de la virulence repose sur trois mécanismes principaux. Premièrement, l'acquisition d'un nouveau gène ou de nouveaux gènes et/ou d'une nouvelle fonction ou de nouvelles fonctions par transfert horizontal de gène médié par des éléments génétiques mobiles, y compris des plasmides, des phages et des éléments d'intégration et de conjugaison. Ces deux derniers peuvent intégrer l'ADN chromosomique et ainsi être répliqués par le chromosome. Les îlots de pathogénicité (PAIs), qui sont de grands groupes de gènes de virulence, ces derniers codent pour un ou plusieurs gènes de virulence absents des génomes de bactéries représentatives non pathogènes de la même espèce ou d'espèces étroitement apparentées. Les PAIs sont fréquemment associés à des gènes d'ARNt qui sont peut-être des restes d'éléments génétiques mobiles. Il n'est pas surprenant que de nombreux traits de virulence présents dans *E. coli* soient portés sur les PAIs ainsi que sur les plasmides et les prophages. Contrairement à d'autres éléments intégratifs, les PAIs ne sont pas répliatifs et n'ont pas la capacité de s'auto-mobiliser. Tous ces éléments acquis se caractérisent par leur mosaïque et leur structure modulaire qui peuvent être considérées comme des blocs de construction moléculaire, permettant de multiples combinaisons conduisant à de multiples phénotypes. Le second mécanisme impliqué dans l'évolution de la virulence est l'inactivation de gènes dont l'expression est incompatible avec la virulence (gènes antivirulence). Dans ce cas, un gène dont l'expression était avantageuse dans un contexte non pathogène est préjudiciable dans le contexte pathogène, un compromis connu sous le nom de pléiotropie antagoniste. Il a été démontré que ce phénomène se produit surtout dans les voies métaboliques. Le dernier mécanisme implique des mutations ponctuelles qui conduisent à un changement de fonction (Desvaux *et al.*, 2020 ; Denamur *et al.*, 2021).

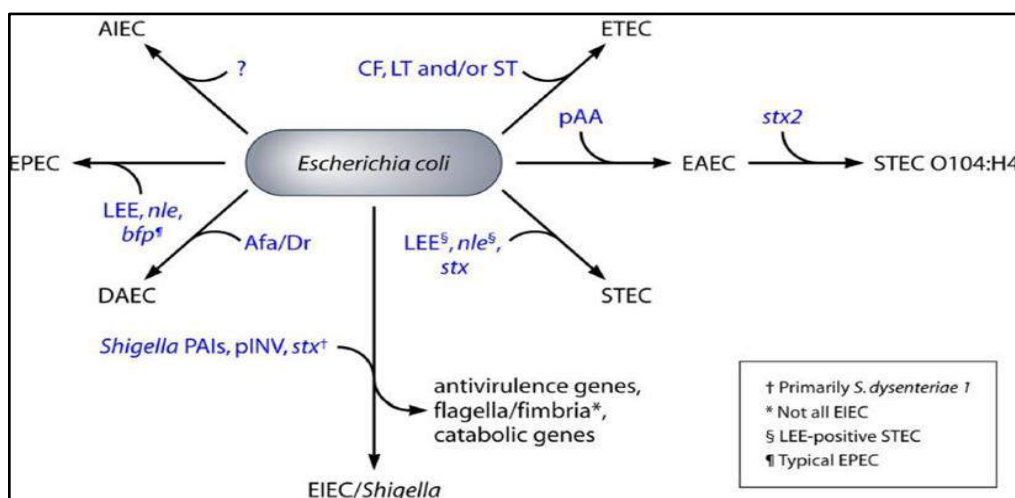


Figure 10. Mécanismes d'acquisition et de délétion de gènes chez *E. coli* appartenant aux différents pathovars (Croxen *et al.*, 2013).

4. *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) ou diarrhéiques (DEC)

Les InPEC sont à l'origine de maladies intestinales et ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Ils sont subdivisés en 7 pathovars majeurs selon le type de maladie engendrée et les facteurs de virulence associés : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), les *E. coli* entéroagréatives (EAggEC), les Adherent Invasive *E. coli* (AIEC) (Oelschlaeger *et al.*, 2002 ; Croxen et Finlay, 2010).

4.1. *E. coli* entéropathogènes (EPEC)

L'EPEC a été le premier pathotype d'*E. coli* à être décrit. De grandes épidémies de diarrhée infantile au Royaume-Uni ont permis en 1945, de décrire un groupe de souches d'*E. coli* sérologiquement distinctes qui ont été isolées chez des enfants souffrant de diarrhée, mais pas chez des enfants en bonne santé. Bien que les grandes épidémies de diarrhée infantile dues à l'EPEC aient largement disparu des pays industrialisés, l'EPEC reste une cause importante de diarrhée infantile potentiellement mortelle dans les pays en voie de développement. Une histopathologie intestinale caractéristique est associée aux infections à EPEC ; connues sous le nom de « attachement et effacement » (A/E). En effet, les EPEC adhèrent intimement à la membrane des cellules épithéliales intestinales où elles forment des micro-colonies. L'adhésion est caractérisée par l'agglomération d'actine polarisée sous la bactérie, l'élaboration d'un piédestal. L'action combinée engendrée par les facteurs de virulence des EPEC provoque l'effacement des microvillosités de l'intestin ce qui peut entraîner de graves conséquences pour le sujet atteint puisque ce phénomène peut diminuer la capacité d'absorption des nutriments chez l'hôte atteint (Kaper *et al.*, 2004).

4.2. *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC sont une variante pathogène ou un pathotype d'*E. coli* défini par la production d'une toxine thermolabile (LT) ou thermostable (ST). Ces bactéries, identifiées à l'origine comme une cause de diarrhée aqueuse de type choléra il y a près de cinq décennies, ont persisté comme une menace majeure pour la santé mondiale, en particulier chez les jeunes enfants dans les régions du monde aux ressources limitées. L'ETEC étant à lui seul lié à des centaines de millions d'épisodes de diarrhée. Alors que la mortalité globale due aux maladies diarrhéiques semble avoir considérablement diminué au cours des dernières

décennies, l'EPEC reste l'une des principales causes de décès chez les jeunes enfants (Bourgeois *et al.*, 2016 ; Fleckenstein et Kuhlmann, 2019).

4.3. *E. coli* entéroinvasives (EIEC)

Les EIEC sont des agents étiologiques de la dysenterie bacillaire chez l'homme, en particulier dans les pays à en voie de développement. La pathogenèse de l'infection par l'EIEC est caractérisée par la capacité des bactéries à envahir la muqueuse colique humaine, conférée par l'expression de gènes chromosomiques et plasmidiques. Cela provoque le syndrome de dysenterie caractéristique, généralement spontanément résolutif, caractérisé par la présence de sang, de mucus et de leucocytes dans les selles (Gomes *et al.*, 2016).

Les manifestations cliniques provoquées par EIEC sont similaires à celles induites par *Shigella spp*, avec qui ils sont étroitement liés par leur virulence et d'autres propriétés phénotypiques. Les souches EIEC sont des pathogènes obligatoires, c'est-à-dire qu'elles ne sont quasiment jamais trouvées à l'état commensal dans la flore intestinale. À l'inverse, les souches EAEC, DAEC, EPEC ainsi que les ExPEC sont des pathogènes non obligatoires, qui peuvent être retrouvées dans les selles des sujets sains avec une fréquence variable selon les individus et les populations humaines étudiées (Smati, 2014 ; Gomes *et al.*, 2016 ; Pasqua *et al.*, 2017).

4.4. *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)

Reconnues pour la première fois comme une cause de maladie humaine en 1982, l'EHEC provoque une diarrhée sanglante (colite hémorragique), une diarrhée non sanglante et le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Le facteur de virulence clé pour EHEC est une Shiga toxine (*Stx*), qui est également connue sous le nom de vérocytotoxine (*Vtx*) en raison de sa toxicité pour les cellules Vero (cellules de reins du singe vert d'Afrique utilisées en culture cellulaire). Cette toxine est sécrétée par certaines souches de *E. coli* : les STEC (Shiga-Toxin-Producing *E. coli*), anciennement connues sous le nom de VTEC (Vero-Toxin-Producing *E. coli*) (Kaper *et al.*, 2004 ; Croxen et Finlay, 2010 ; Diallo, 2013).

4.5. *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Décrites pour la première fois en 1987, généralement associées à une diarrhée persistante (plus de 14 jours) chez les enfants âgés de 18 mois à 5 ans, les DAEC sont un groupe hétérogène qui génère un schéma d'adhérence diffus sur les cellules HeLa et HEp-2. Ce modèle est médié par des protéines codées par une famille d'opérons apparentés,

qui comprennent à la fois des adhésines fimbriales (par exemple, Dr et F1845) et afimbriales (Afa). Les isolats de DAEC qui expriment l'une des adhésines Afa-Dr (appelées Afa-Dr DAEC) colonisent l'intestin grêle et n'engendrent pas uniquement des diarrhées, mais sont également impliqués dans les troubles urinaires récurrents et dans des infections des voies respiratoires chez les adultes (Servin, 2014 ; Diallo, 2013 ; Lezzar, 2017).

4.6. *E. coli* entéroagréatives (EAEC ou EAaggEC)

L'EAEC a été décrite pour la première fois en 1985, reconnue par son adhérence distinctive aux cellules HEp-2 dans un motif agrégatif empilé en forme de brique (Harrington *et al.*, 2006 ; Estrada-Garcia, 2014).

Ce schéma d'adhérence, qui se distingue des schémas d'adhérence manifestés par l'EPEC et le DAEC, a été associé pour la première fois de manière significative à la diarrhée chez les enfants à Santiago, au Chili, en 1987. L'EAEC est également lié à la diarrhée chez les adultes, y compris les patients séropositifs et les voyageurs, et a été une cause d'épidémies d'origine alimentaire dans le monde industrialisé. Après adhérence, certaines souches d'EAEC sont capables de produire plusieurs toxines et cytotoxines qui peuvent provoquer de sévères séquelles épithéliales. Parmi ces toxines figurent l'entérotoxine 1 thermostable d'*E. coli* (EAST1), la toxine codée par un plasmide (pet) ou encore Shigella entérotoxine 1 (SHET1) (Harrington *et al.*, 2006 ; Estrada-Garcia, 2014).

4.7. *E. coli* adhérents invasives (AIEC)

Les AIEC, nouveau pathotype généralement associé à la maladie de Crohn, se distinguent des autres souches d'*E. coli* par la présence de facteurs de virulence non classiques d'adhérence et d'invasion. Ce phénotype a été proposé comme une catégorie pathogénique distincte. Plusieurs études menées principalement avec des souches isolées de patients adultes atteints de la maladie de Crohn suggèrent que les souches AIEC sont impliquées dans l'apparition et/ou la persistance de la maladie. Ainsi, les AIEC sont capables d'adhérer et d'envahir les entérocytes, et de survivre et se répliquer dans les macrophages sans provoquer la mort de la cellule hôte (Shawki et McCole, 2017 ; Perna *et al.*, 2020).

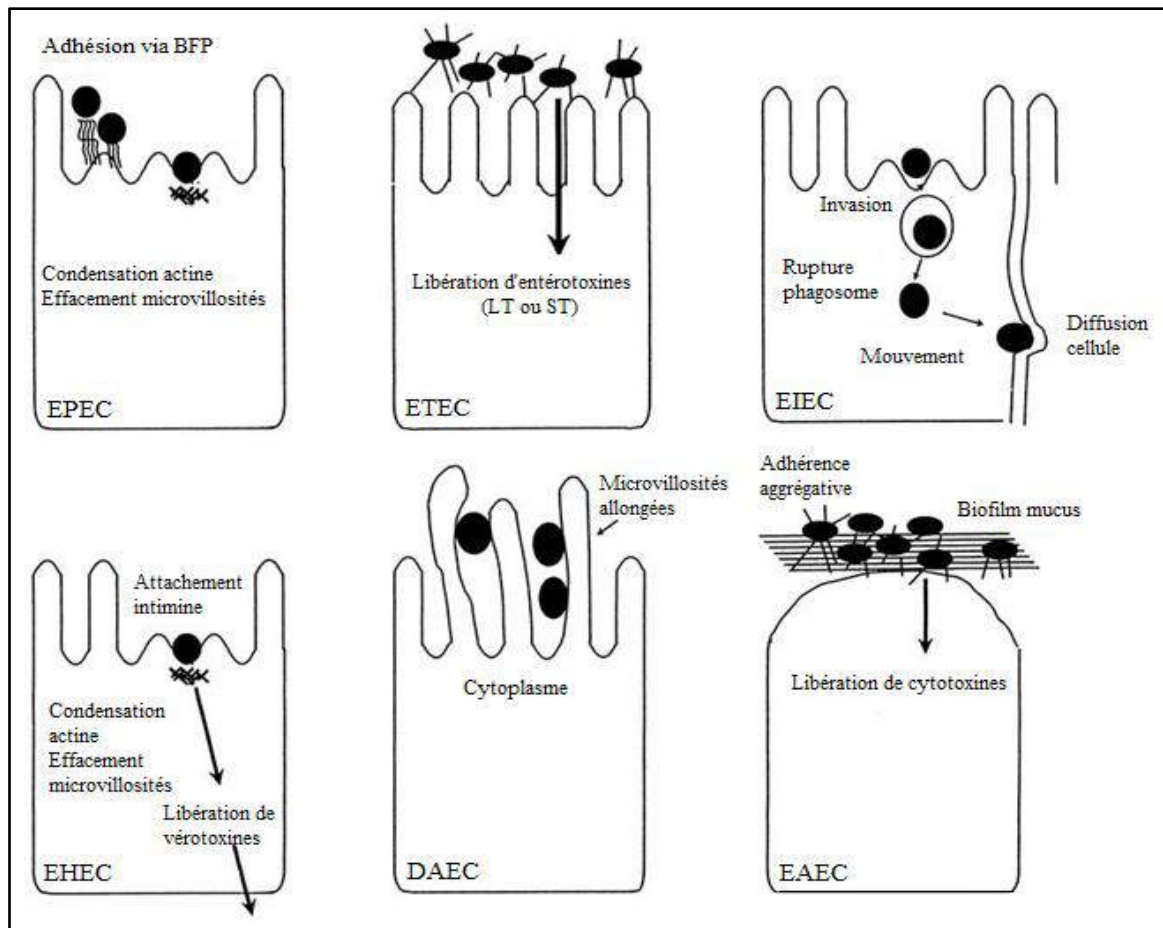


Figure 11. Pathogénie associée aux classes de *E. coli* responsables de diarrhées (d'après Nataro et Kaper, 1998).

5. *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)

Les souches ExPEC sont des bactéries polyvalentes qui peuvent causer des infections des voies urinaires, de la circulation sanguine, de la prostate et d'autres infections au niveau de sites non intestinaux. Ils occupent généralement une niche dans le microbiote intestinal de l'homme (et d'autres animaux), et c'est de ce réservoir qu'ils émergent pour provoquer des infections extra-intestinales. Contrairement aux *E. coli* commensaux, les ExPEC ont la capacité de provoquer la maladie une fois hors du réservoir intestinal de l'hôte en raison de la possession de facteurs de virulence pathogènes. Les ExPEC sont séparées en groupes déterminés par association de maladies, y compris les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* associés à la méningite néonatale (NMEC) et les *E. coli* causant une septicémie (SEPEC). Les souches ExPEC sont responsables d'un nombre très important d'infections humaines dans le monde. Les souches ExPEC ont également la tristement célèbre distinction d'être associées à l'acquisition de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques (Dale et Woodford, 2015 ; Mange *et al.*, 2020).

5.1. *E. coli* uropathogènes (UPEC)

Les UPEC sont le plus souvent associées à des maladies humaines et sont la principale cause d'infections des voies urinaires (ITUs) dans 80% des cas incluant les cystites et les pyélonéphrites. Dans la plupart des cas, l'origine de l'UPEC est le propre microbiote intestinal du patient, indiquant une transmission fécale-périnéo-urétrale vers la vessie. Lorsque les UPEC colonisent la vessie, elles provoquent des cystites (ITU inférieure), mais dans le cas où elles atteignent les reins, elles provoquent une pyélonéphrite (ITU supérieure). Les souches UPEC agissent comme des pathogènes intracellulaires opportunistes, profitant du comportement et de la sensibilité de l'hôte en utilisant un répertoire diversifié de facteurs de virulence pour coloniser les voies urinaires (Wiles *et al.*, 2008 ; Ulett *et al.*, 2013 ; Subashchandrabose et Mobley, 2017). Ces marqueurs de virulence se divisent en deux groupes : le premier, les FVs de surface bactérienne comprend le plus souvent les adhésines (les fimbriae de type 1 et les fimbriae P). Ces fimbriae aident à l'adhésion à la surface de la cellule hôte, à l'invasion des tissus (ce qui est important dans la pathogenèse des UPEC provoquant des infections urinaires), à la formation de biofilms et à l'induction de cytokines. Le facteur de virulence de surface bactérienne comprend également les flagelles, le lipopolysaccharide capsulaire et les protéines de la membrane externe. Le second groupe représente les FVs sécrétés comme l'hémolysine et les sidérophores (Lüthje et Brauner, 2014 ; Shah *et al.*, 2019).

5.2. *E. coli* pathogènes associées à la méningite néonatale (NMEC)

Les NMEC ont la capacité de survivre dans le sang et d'envahir les méninges des nourrissons pour provoquer une méningite. Elle est l'une des infections les plus courantes expliquant les taux élevés de mortalité et de morbidité (10 à 30%), ainsi que des risques élevés de séquelles neurologiques pendant la période néonatale (Wijetunge *et al.*, 2015). Les NMEC sont également associées à la septicémie. Afin de provoquer la méningite, les NMEC transloquent du lumen intestinal vers la circulation sanguine. Puis, elles se multiplient (grâce à la présence d'une capsule de type K1, de protéines OmpA et de système d'acquisition de fer) causant une bactériémie. Finalement, elles franchissent la barrière hémato-encéphalique pour envahir le système nerveux central (fimbriae de type 1, protéine Ompa, fimbriae de type S et d'auto-transporteur AG43 assurent l'adhésion ; protéines Ibe et le facteur CNF-1 assurent l'invasion au niveau des cellules endothéliales du cerveau) causant une méningite (Cuevas-Ramos, 2010 ; Kim, 2016).

5.3. *E. coli* pathogènes associées à la septicémie (SEPEC)

Les SEPEC sont les microorganismes les plus fréquemment isolés du sang de patients atteints de septicémie. Elles envahissent la circulation sanguine et infectent plusieurs organes par la suite. Divers facteurs de virulence sont liés à la SEPEC humaine, comprenant la sécrétion de toxines telles que HlyA (hémolysine), Sat (toxine auto-transporteuse sécrétée) et CNF-1 (facteur nécrosant cytotoxique 1). Ces toxines peuvent modifier la forme et/ou la fonction de la cellule hôte. Malgré son importance médicale, SEPEC est un pathotype peu étudié et on ne sait toujours pas comment ces bactéries traversent la barrière endothéliale et accèdent à la circulation sanguine (Tibo *et al.*, 2016).

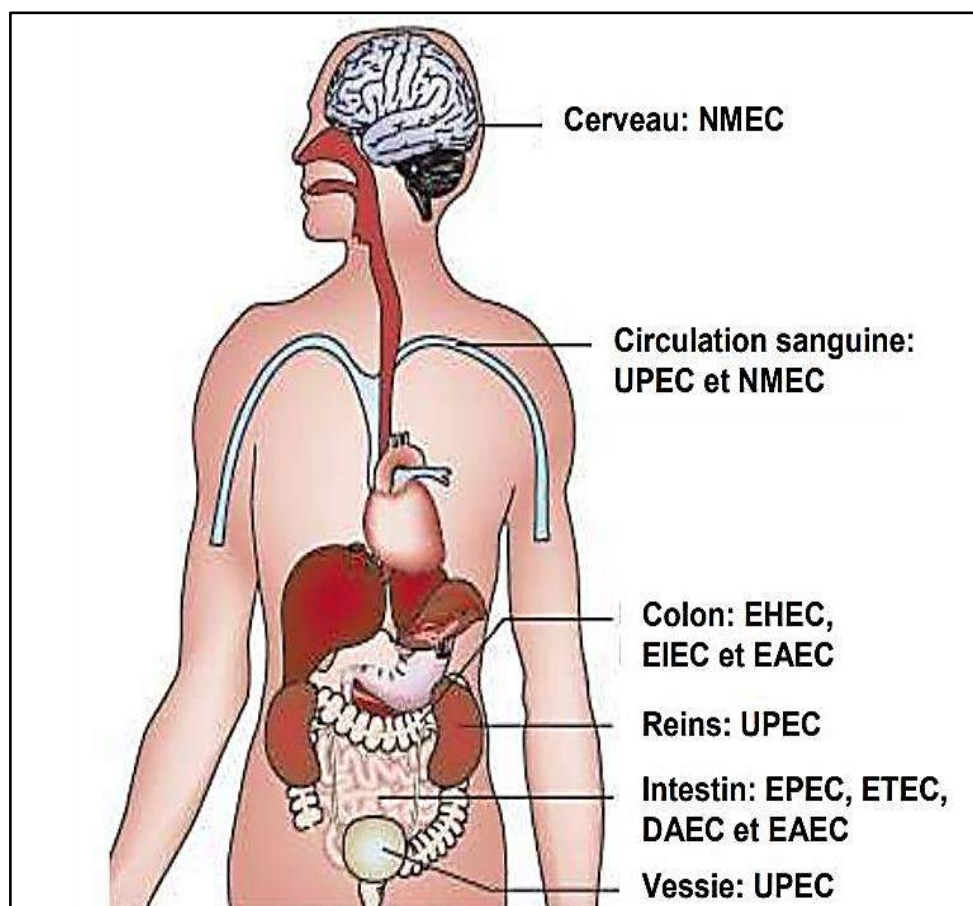


Figure 12. Sites de colonisation des différents groupes d'*E. coli* pathogènes (Miquel, 2010). *E. coli* entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhées, alors que *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* entéroinvasif (EIEC) colonisent plutôt le colon ; *E. coli* entéroaggrégatif (EAEC) peut coloniser les deux. *E. coli* uropathogène (UPEC) colonise le tractus urinaire jusqu'à la vessie et est à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie.

6. *E. coli* pathogènes hybrides (HyPEC)

E. coli a une étonnante facilité à très bien s'adapter, se répliquer et se disséminer. Ces caractéristiques ont permis l'acquisition de gènes de virulence et de nouvelles fonctions, apparaissant à partir de mutations, de recombinaisons et d'autres changements génétiques. Toutes ces différences génétiques ont augmenté la survenue de nouveaux facteurs de virulence ainsi que de nouvelles résistances (Braz *et al.*, 2020).

Tous les pathotypes ExPEC et InPEC ne suffisent pas à classer complètement toutes les souches pathogènes d'*E. coli*, car ces bactéries sont si variables, qu'elles permettent l'apparition constante de souches hybrides distinctes au sein de cette espèce bactérienne dynamique. Le portage de gènes de virulence essentiels à la pathogénèse de chaque pathotype et la capacité d'adaptation à différentes conditions permettent l'émergence d'*E. coli* pathogènes hybrides (HyPEC) (Braz *et al.*, 2020). Les termes « hybrides » et « hétéro-pathogènes » ont émergé pour désigner des souches potentiellement plus virulentes qui présentent une combinaison de facteurs de virulence, que l'on croyait auparavant spécifiques à chaque pathotype d'*E. coli*. Le terme « hétéro-pathogènes » désigne les souches qui hébergent des gènes de virulence caractéristiques de deux pathotypes InPEC ou plus. Ainsi, les hétéro-pathogènes sont strictement des entéro-pathogènes, et leur désignation est basée sur la présence de pathotypes spécifiques de InPEC associés à des facteurs de virulence. Leur définition est simple, car les gènes qui délimitent la InPEC sont bien définis. En revanche, les souches « hybrides pathogènes » présentent à la fois des facteurs de virulence définissant InPEC et ExPEC ou, alternativement, sont isolées d'une infection extra-intestinale et codent des facteurs de virulence définissant InPEC. Le critère alternatif de désignation en tant que pathogène hybride est requis en raison de l'ambiguïté des ensembles de gènes requis pour définir les souches ExPEC (Santos *et al.*, 2020).

La forte prévalence d'*E. coli* pathogène classique et l'apparition de HyPEC se produisent via des mécanismes génétiques similaires, qui permettent également aux bactéries de résister à la présence d'antibiotiques distincts. Les bactéries résistantes à diverses classes d'antibiotiques sont liées à la combinaison complexe de gènes de résistance intrinsèques et de nouveaux FVs acquis, qui peuvent agir en synergie. Ensemble, cela est signalé comme un facteur alarmant dans le monde entier chez plusieurs espèces bactériennes. De ce fait, aucune souche unique d'*E. coli* ne peut être considérée comme représentative de l'espèce.

Dans ce scénario, l'application des limites génétiques établies pour les pathotypes archétypaux dans les études épidémiologiques impliquant *E. coli* s'est révélée être un objectif insaisissable. Des événements impliquant des souches hybrides ou hétéro-pathogènes d'*E. coli* ont entériné cette perspective et brouillé la classification des souches d'*E. coli* en pathotypes classiques (Lara *et al.*, 2017 ; Braz *et al.*, 2020).

Tableau 02 : Caractéristiques résumées des hybrides et des hétéropathogènes (Santos *et al.*, 2020).

	Source d'isolement	Traits de virulence		Maladie	Sérogroupe ou sérotype	MLST-Phylogroupe ^a
EAEC/STEC	Infections intestinales	Stx et fimbriae agrégatives avec régulateur aggR		Diarrhée, diarrhée sanglante et SHU	O104:H4 O59:H- O rough:H- O111:H2 O89:H- O23:H28	ST678-B1 ST26-B1 ST1136-B1
EPEC/STEC	Infections intestinales chez l'homme, l'intestin des animaux, l'environnement et les aliments	LEE PAI et Stx	Intimine (divers sous-types) et Stx	Diarrhée, diarrhée sanglante et SHU	O157:H7 O145 O103 O26 O111	ST11-E ST32cplx-D ST20cplx-B1 ST29cplx-B1
	Échantillon fécal normal	LEE PAI, Stx-2f et BFP	Identifié uniquement chez les oiseaux		O137:H6	ST2678-B2
EPEC/ETEC	Infections intestinales	LEE PAI et LT ou ST	Indépendamment de la présence de BFP	Diarrhée liquide	Inconnu	ST278cplx-B1 ST1788-A
ExPEC/STEC et ExPEC/EHEC^b	Diarrhée et infections extra-intestinales simultanément ou infections extra-intestinales uniquement	Stx et Facteurs de virulence intrinsèques ExPEC		ITU, cystite hémorragique, SHU, bactériémie	O2:H6 O76:H19 O:nt:H- O80:H2 O145:H-	ST141-B2 ST675-B1 ST10cplx-A ST165cplx-A ST32cplx-D
ExPEC/EPEC	Infections extra-intestinales uniquement ou diarrhée suivie d'une infection extra-intestinale	LEE PAI uniquement ou LEE PAI et Facteurs de virulence intrinsèques ExPEC	Indépendamment de la présence de BFP	Cystite, pyélonéphrite, bactériémie liée aux ITU et diarrhée avec dysfonctionnement de plusieurs organes	O71 O78:H- O4:H1 O12:K1:H-	Inconnu ST2018-B2 ST12-B2 Inconnu
STEC/ETEC	Infections intestinales chez l'homme et l'animal	Stx et toxine ST	Diverses variantes Stx2 ; Stx1 est souvent faible	Diarrhée, diarrhée sanglante et SHU	Divers sérogroupe (>40 sérotypes)	ST10cplx-A ST40cplx-B1 ST325-A ST329-A
ExPEC/EAEC	Infections extra-intestinales	Fimbriae agrégatif avec régulateur aggR uniquement ou avec facteurs de virulence intrinsèques ExPEC		Infections extra-intestinales non lié à la diarrhée	Différents sérogroupe (O5, O6, O11, O15, O18, O78, etc.)	ST10cplx-A est plus fréquemment signalé ST69-D ST131-B2
ExPEC/ETEC	Infections extra-intestinales	Facteurs de virulence ETEC uniquement		ITU	Inconnu	Inconnu

LEE PAI, locus de l'îlot de pathogénicité de l'effacement des entérocytes ; SHU, syndrome hémolytique et urémique ; BFP, pili formant un faisceau ; Stx, toxine de Shiga ; ST, toxine thermostable d'ETEC ; LT, toxine thermolabile d'ETEC ; UTI, infection des voies urinaires ; Facteurs de virulence intrinsèques ExPEC—présence de deux facteurs de virulence ou marqueurs génétiques parmi les suivants : fimbriae P (pap), fimbriae S (sfa/foc), famille des adhésines afimbriales (afa/dra), aéro bactéine (iut/iuc) et capsule de groupe II capsulaire (kpsMTII).

^a Le typage de séquences multilocus (MLST) et la relation phylogroupe ont été décrits comme disponibles dans *Escherichia/Shigella* Enterobase de la Warwick Medical School (Zhou *et al.*, 2020) ; STn°—numéro de type de séquence ; STn°cplx—complexe de type séquence ; Le complexe ST fait référence aux ST qui sont regroupés en complexes clonaux par leur similitude avec un profil allélique central.

^bEHEC est utilisé pour désigner les souches qui hébergent LEE et Stx simultanément.

*Matériel et
méthodes*

1. Patients et méthode

La confection du souchier a été réalisée au sein du service de microbiologie (laboratoire de bactériologie) du CHU Benbadis Constantine qui reçoit des prélèvements biologiques en provenance des divers services de cet établissement hospitalier, afin de récolter un maximum d'isolats d'*E. coli* issus d'urine de patients présentant une infection urinaire et des isolats d'*E. coli* issus de différentes infections extra-intestinales.

1.1. Paramètres cliniques

Une fiche d'identification du prélèvement a été établie pour définir la traçabilité (depuis le service source jusqu'au service de réception) de chaque prélèvement, et comprend : le service de provenance, la nature du prélèvement, ainsi que l'identification du patient (nom et prénom, âge et sexe du patient). Les paramètres cliniques suivants ont été fixés à travers tous ces éléments.

1.1.1. Source du prélèvement biologique

Ce paramètre permet de distinguer les patients hospitalisés ayant contracté des infections nosocomiales (ou infections intra-hospitalières) par rapport aux patients ambulatoires contractant des infections de type communautaires (ou infections extra-hospitalières), et de se faire une idée exacte sur l'antibiothérapie appliquée.

1.1.2. Nature du prélèvement biologique

Il est nécessaire de définir l'origine biologique du prélèvement afin de déterminer les sites anatomiques les plus significativement atteints.

1.1.3. Âge des patients

Les prélèvements ont été regroupés en fonction de l'âge des patients et catégorisés en tranches d'âge.

1.1.4. Sexe des patients

La détermination d'un ratio « Féminin/Masculin » global des patients a été faite ainsi qu'un ratio « Féminin/Masculin » spécifique selon la nature du prélèvement et l'âge (ou tranche d'âge) des patients. Les résultats obtenus permettent souvent d'expliquer la cause de l'infection.

1.2. Devenir des prélèvements biologiques

Tout prélèvement biologique suspecté, obtenus sur des patients du CHU Benbadis Constantine (hospitaliers et ambulatoires), ont été acheminés vers le laboratoire de bactériologie pour y être analysé et étudié.

2. Traitement des prélèvements

- **Critères d'inclusion** : l'étude englobe toutes les souches d'*E. coli* isolées à partir de différents prélèvements biologiques provenant de patients hospitalisés et ambulatoires.
- **Critères d'exclusion** : seront exclus tous les autres microorganismes isolés dans les prélèvements.

Les isolats ont subi des analyses bactériologiques, antibiotypiques et moléculaires spécifiques à notre étude.

2.1. Examen cyto bactériologique des urines

Les prélèvements d'urine ont subi en premier lieu un examen cyto bactériologique des urines (ECBU) afin de confirmer l'infection urinaire à *E. coli*.

- **Aspect de l'urine** : la visualisation de l'aspect du prélèvement urinaire à l'œil nu (présence d'un trouble, couleur, odeur)
- **Examen microscopique** : l'examen microscopique a été réalisé directement à l'état frais entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique au faible grossissement (X40). Une coloration de Gram est nécessaire pour la recherche de bactéries et une au bleu de méthylène pour la recherche d'éléments cellulaires (leucocytes, hématies et cellules épithéliales).
- **Dénombrement** : la leucocyturie a été fait au microscope à l'état frais tandis que la bactériurie sur milieu sélectif ; gélose BCP pour *E. coli* et les bactéries à Gram négatif.

2.2. Analyse bactériologique

La réalisation de ces analyses représente le point de départ d'une identification rationnelle, et consiste à mettre en évidence quelques caractères importants qui permettront d'identifier les bactéries issues des prélèvements urinaires et autres.

L'analyse bactériologique a été faite au niveau du laboratoire de bactériologie (service de Microbiologie du CHU Benbadis Constantine).

2.2.1. Identification des caractères cultureux

Pour chaque prélèvement obtenu, on a réalisé une suspension bactérienne, en déchargeant une colonie suspecte dans 5 ml d'eau physiologique. Une première sélection sur gélose Hektoen a été réalisée (milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des entérobacilles à Gram négatif) cultivé à 37°C pendant 24h. Les colonies ainsi obtenues ont par la suite été cultivées sur gélose nutritive (GN) pendant 24h à 37°C afin de s'assurer de la pureté de la souche (Delarras, 2014).

2.2.2. Caractérisation biochimique

La confirmation de l'appartenance à l'espèce *E. coli* a été faite par tests biochimiques. La galerie biochimique peut prendre un aspect complet ou réduit selon le type de recherche, l'aspect particulier d'*E. coli* sur milieu Hektoen réduit le champ de recherche pour l'identification de la souche en le limitant à quelques milieux qui s'orientent vers l'étude du métabolisme glucidique et protéique (Delarras, 2014).

2.2.2.1. Étude du métabolisme glucidique

- **Milieu Clark et Lubs (test RM et VP)**

Ce milieu permet de mettre en évidence des voies de fermentation des glucides. À partir de ce milieu deux propriétés fermentaires vont être testées.

- **Voie des acides mixtes :** c'est la réaction du rouge de méthyle (RM). On a prélevé 2 ml du milieu Clark et Lubsensemencé depuis 24 heures à l'étuve (37°C). On a déposé ce volume dans un tube à hémolyse, puis on a ajouté 2 à 3 gouttes d'une solution alcoolique de rouge de méthyle à 0,2%. Une coloration rouge indique que la réaction est positive.

- **Voie du butane-2,3-diol** : c'est la réaction de Voges Prauskauer (VP). On a transvasé, dans un tube à essais de 16X160mm la culture de 24 heures sur milieu de Clark et Lubs, puis on a ajouté 0,5 ml d'une solution d'alpha-naphtol et 0,5 ml d'une solution de potasse à 16%. L'apparition d'une coloration rose signe une réaction positive. Cette réaction nécessite au moins dix minutes pour se manifester.
- **O-Nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG)**

Permet de détecter l'enzyme β-galactosidase dont le rôle est de décomposer le lactose en glucose et galactose. La réaction a été réalisée à partir d'une suspension épaisse de la bactérie testée dans de l'eau distillée. Un disque imprégné d'ONPG a été ajouté avec une pince flambée, mais refroidie puis incubée 30min à 37°C.

- **Milieu Citrate de Simmons**

Permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone. L'ensemencement a été réalisé à partir d'une culture provenant d'un milieu gélosé. Après incubation de 24 heures à 37°C, on a cherché, sur la tranche du milieu, l'apparition d'une culture. Le test est alors positif lors d'un virage de l'indicateur coloré (bleu de bromothymol) qui passe du vert au bleu, à la condition que le tube ne soit pas fermé hermétiquement.

- **Milieu TSI**

Permet la mise en évidence de la fermentation du glucose, du lactose et/ou saccharose et de la production de gaz et de sulfure d'hydrogène H₂S. À partir d'une colonie suspecte prélevée sur le milieu sélectif (Hektoen), le culot a été ensemencé par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, le test est positif pour :

- Le glucose s'il y a virage du rouge vers le jaune au niveau du culot,
- Le lactose et/ou le saccharose, si le virage s'effectue au niveau de la pente,
- La production de gaz dans le cas d'apparition de bulle au niveau du culot,
- La production de H₂S, s'il y a formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

- **Milieu Mannitol-Mobilité**

Permet l'identification des bacilles Gram négatif dont les Entérobactéries en mettant en évidence la fermentation du Mannitol et la mobilité de la souche. Une colonie suspecte a été prélevée à partir du milieu sélectif et a été ensemencée par piqûre centrale. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, le test est positif pour :

- La fermentation du Mannitol s'il y a virage du rouge vers le jaune,
- La mobilité de la souche, si le milieu devient trouble en partant de la piqûre centrale vers la paroi du tube.

2.2.2.2. Étude du métabolisme protéique

- **Urée-Indole (Urée-Tryptophane)**

Permet la mise en évidence de 3 enzymes : l'uréase, la tryptophane désaminase (TDA), la tryptophanase (hydrolyse le tryptophane en indole). L'ensemencement a été réalisé à partir d'une culture sur milieu solide, puis incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le test est positif pour la présence de l'uréase si la couleur vire du brun-orangé vers le rose. Après cette lecture, on sépare le milieu en deux de manière égale, afin de réaliser les deux tests suivants : dans un des deux tubes, ajouter 1 à 2 gouttes du réactif de chlorure de fer III. Le test est positif pour la tryptophane désaminase (TDA) s'il y a formation d'un précipité ou une coloration marron foncé. Dans le tube restant, ajouter 1 à 2 gouttes du réactif de Kovacs. Le test est positif pour la tryptophanase (production d'indole) s'il y a formation d'un halo rouge.

- **Catalase**

Permet la mise en évidence de l'enzyme catalase qui sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène. La catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène ($2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$).

À l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie isolée d'une culture pure a été prélevée (18 à 24 heures d'incubation) et déposée sur une lame de microscope. Une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% a été ajoutée sur la colonie. Le test est positif pour la catalase s'il y a formation rapide de bulles.

2.2.3. Détermination de la résistance aux antibiotiques (antibiogramme)

C'est un examen qui permet d'étudier le paramètre sensibilité/résistance des germes aux antibiotiques et par conséquent de cibler le traitement antibiotique efficace sur le germe et est évalué sur chaque souche à l'aide d'un panel d'antibiotiques représentatif.

La méthode utilisée dans notre étude est celle de la diffusion sur gélose spécifique Mueller-Hinton de Kirby-Bauer comme préconisée par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme-Société Française de Microbiologie). Chaque souche a été testée avec le même panel d'antibiotique. Des colonies de chaque souche prélevées sur boîte Hektoen (ensemencée la veille) ont été déchargées dans 5 ml d'eau physiologique. La suspension bactérienne obtenue est homogénéisée par agitation puis étalée sur boîte de Muller-Hinton à l'aide d'écouvillon stérile, ensuite les disques d'antibiotiques ont été déposés sur la surface en utilisant un distributeur à disques. Les boîtes ont été cultivées à 37°C pendant 24h.

La lecture de l'antibiogramme a été faite sur chaque boîte en mesurant les diamètres des zones d'inhibition et l'interprétation a été faite par la comparaison des résultats avec les valeurs des diamètres contenues dans la table de lecture : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) pour les Entérobactéries (Annexe 01) (CA-SFM, 2016).

Tableau 03. Liste des antibiotiques testés et les familles d'antibiotiques correspondantes.

Antibiotique	Concentration des disques d'antibiotiques	Famille
Amoxicilline (amx)	25 µg	Béta lactamine
Amoxicilline-Ac clavulanique (amc)	20 µg /10 µg	
Ticarcilline (tic)	75 µg	
Piperacilline (pip)	100 µg	
Cefazoline (cfz)	30 µg	
Cefoxitine (fox)	30 µg	
Cefotaxime (ctx)	30 µg	

Imipenem (ipm)	10 µg	
Gentamycine (gen)	10 µg	Aminoside
Amikacine (amk)	30 µg	
Ac nalidixique (nal)	30 µg	Quinolone
Ciprofloxacine (cip)	5 µg	
Sulfamethoxazole-Trimethoprim (sxt)	23,75/1,25 µg	Sulfamide + Diaminopyrimidine
Colistine (cst)	10 µg	Polymyxine
Chloramphenicol (chl)	30 µg	Phénicol
Nitrofurantoine (nit)	300 µg	Nitrofurane

2.2.4. Méthodes de conservation

E. coli et la plupart des espèces à Gram négatif peuvent être gardées de plusieurs façons suivant la période de conservation. Pour de longues périodes, la plus simple est d'ensemencer la souche en « gélose profonde », dans un tube contenant un milieu gélosé : avec une anse on introduit des bactéries à l'intérieur de la gélose, puis on scelle le tube.

Les isolats d'*E. coli* ainsi détectés et testés ont été conservés dans des tubes contenant un milieu de conservation (Dimed) pour la réalisation d'un soucier et en vue d'une étude moléculaire.

2.3. Étude moléculaire

L'étude moléculaire qui a suivi la caractérisation phénotypique des souches d'*E. coli* a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche M2iSH, INSERM/Université d'Auvergne 1071, UCS INRA 2018 Clermont-Ferrand, France.

Une analyse phylogénétique a été réalisée afin de mieux caractériser les souches en fonction de la classe phylogénétique à laquelle ils appartiennent. Par la suite, nous avons effectué un criblage par PCR de 9 gènes des souches ExPEC. Des souches de références ont été sélectionnées comme témoins positifs (Annexe) et choisies en fonction de leurs appartenances à un pathovar et à un groupe phylogénétique bien précis pour permettre la détermination du profil génétique.

2.3.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée par lyse thermique. Les bactéries ont été prélevées du milieu de conservation et ont été mises en culture dans des tubes Falcon de 15 ml avec 10 ml de bouillon LB « Lysogeny Broth » incubés à 37°C pendant 24 h. Afin d'obtenir les lysats bactériens, la totalité du volume du bouillon de culture obtenu comme décrit précédemment a été centrifugée à 4800 rpm pendant 10 min suite à cela le culot a été repris avec 1 ml d'eau distillée dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Le contenu a été porté à ébullition dans un ThermoStat plus Eppendorf à 95°C pendant 15 min, après centrifugation (10 000 rpm, 5 min, 4°C) le surnageant a été récupéré dans des tubes Eppendorf de 2 ml et a été conservé à - 20°C jusqu'à analyse.

2.3.2. Analyse phylogénétique

Classer et déterminer le groupe phylogénétique des souches d'*Escherichia coli* permet de donner des informations sur leurs pouvoirs pathogènes et déterminer la relation entre phylogroupe et gènes de virulence étudiés. Le classement phylogénétique des souches étudiées a été réalisé par PCR Multiplex décrite par Clermont et *al.* (2013). Cinq gènes sont impliqués dans la détermination du groupe ; *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*, *arpA*, *trpA* et permet de classer les *E. coli* en 8 groupes : A, B1, B2, C, D, E, F et *E. clades*. L'analyse phylogénétique a été réalisée en trois étapes :

- PCR Quadruplex ; permet de classer les groupes B1, B2, F, A/C, D/E et *E. clades*.
- PCR Duplex (spécifique du groupe E) ; permet d'identifier les souches du groupe D des souches du groupe E.
- PCR Simplex (spécifique du groupe C) ; permet d'identifier les souches du groupe A des souches du groupe C.

Le réactif utilisé est le QIAGEN® Multiplex PCR Kit pour la réaction PCR Quadruplex ainsi que la PCR Duplex spécifique du groupe E. La PCR Simplex du groupe C a été réalisée avec la Taq Promega®. Les amorces utilisées dans cette étude (gènes cibles, nom des amorces, séquences oligo-nucléotidiques, taille des produits amplifiés et les références) sont présentées dans le tableau 03.

Tableau 04. Caractéristiques des amorces utilisées pour la détermination du phylogroupe.

PCR	Gène	Amorce	Séquence (5'→3')	Taille de la région amplifiée (pb)	Mix (µl)
Quadruplex	<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	5
		ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		5
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	5
		yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		5
	<i>TspE4.C2</i>	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	5
		TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		5
	<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	12
		ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA		12
Groupe E (Duplex)	<i>arpA</i>	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	5
		ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG		5
Contrôle Interne	<i>trpA</i>	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	3
		trpBA.r	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		3
Groupe C (Simplex)	<i>trpA</i>	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCAG	219	5
		trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC		5

Tableau 05. Composition du milieu réactionnel de PCR Quadruplex et la PCR Duplex.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN	2
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	6,25
5x Q-Solution	1,25
Mix amorces	1,25
H ₂ O bi-distillée	1,75
Total	12,5

Tableau 06. Composition du milieu réactionnel de PCR Simplex.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN	5
Taq polymérase	0,25
Tampon	10
Amorce F	5
Amorce R	5
DNTP	1
H ₂ O bi-distillée	23,75
Total	50

Tableau 07. Programme du thermocycleur pour l'amplification des gènes de phylogroupage.

	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Élongation	Élongation finale	Nombre de cycles
Quadruplex	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	56 °C / 30 sec	72 °C / 120 sec	72 °C / 10 min	30
Duplex	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	60 °C / 30 sec	72 °C / 120 sec	72 °C / 10 min	35
Simplex	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	62 °C / 30 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 10 min	35

L'amplification a été révélée aux UV après 30min à 30V dans une cuve électrophorétique et dans un gel d'agarose à 2% contenant 5 µl de Clear Sight DNA Strain. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le SF (100 pb - 1000 pb).

2.3.3. Criblage des facteurs de virulence

Dans le but de limiter le nombre de gènes d'intérêt à étudier, le criblage par PCR des isolats d'*E. coli* pour les gènes de virulence a été réalisé sur 9 gènes codants des facteurs de virulence différents. Ces gènes ont été choisis en fonction de leurs pouvoirs pathogènes et de leurs appartenances à un pathovar. Ainsi, chaque facteur de virulence est généralement lié à l'un des 8 pathovars étudiés qui se caractérisent par la présence d'un ou deux facteurs de virulence ; *pap* et *hlyA* (UPEC), *afa* (DAEC *afa/dr*), *ST1* (ETEC), *invE* (EIEC), *stx1* et *stx2* (EHEC/STEC), *eaeA* (EHEC, EPEC) et *astA* (EAEC).

Notre recherche vise à cribler ces facteurs en comparaison avec les souches de références citées précédemment (Annexe 02).

Les amorces utilisées (gènes cibles, nom des amorces, séquences oligo-nucléotidiques, taille des produits amplifiés) sont présentées dans le tableau 07.

Tableau 08. Caractéristiques des amorces utilisées pour la détermination du profil de génétique de virulence.

Facteur de virulence	Gène	Séquence amorce (5'→3')	Taille de la région amplifiée (pb)	Témoins positifs
pili associated with pyelonephritis	<i>pap</i>	F : GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328	-UTI 89 -CFT 073 -536 Tour
		R : ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
Hémolysin	<i>hlyA</i>	F : AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	C1845
		R : ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA		
afimbrial adhesins	<i>afa/dr</i>	F : GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	792	E17-2
		R : CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG		
EAEC heat-stable enterotoxin I (EAST-1)	<i>astA</i>	F : ATGCCATCAACACAGTATAT	110	EDL 933
		R : GCGAGTGACGGCTTTGTAGT		
Shigatoxine 1	<i>stx1</i>	F : GATAAATCGCCATTCGTTGACTA	180	-EDL 933 -E2348/69
		R : AGAACGCCCACTGAGATCATC		
Shigatoxine 2	<i>stx2</i>	F : GGCAGTGTCTGAAACTGCTCCT	254	H10407
		R : TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
Intimine	<i>eaeA</i>	F : CAGGTGAAACTGTTGCCGATC	204	E1286010
		R : CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
Heat-stable enterotoxin	<i>STI</i>	F : TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG	160	E1286010
		R : GGCAGGATTACAACAAAGTTCACA		
Regulator for cell invasion	<i>InvE</i>	F : ATATCTCTATTTCCAATCGCGT	382	E1286010
		R : GATGGCGAGAAATTATATCCCG		

L'amplification génique a été effectuée dans un milieu réactionnel (tableau 08) contenant : de l'extrait d'ADN, les amorces (Eurogentec®) et le master mix constitué d'une Taq ADN polymérase, 5x de tampon PCR (0,4M Tris-HCl, 0,1M (NH₄)₂SO₄, 0,1% w/v Tween-20), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Bue dye (équivalent migratoire à 3,5 - 4,5 kb de fragment d'ADN), Yellowdye (équivalent migratoire à 35 - 45 kb de fragment d'ADN) (5x FIREPol® Master Mix, SolisBioDyne®).

Tableau 09. Composition du milieu réactionnel de PCR pour la détermination du profil de génétique de virulence.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN	2
Master Mix	4
H ₂ O bi-distillée	13
Amorces (F et R)	0,5
Total	20

Les programmes PCR utilisés pour chaque gène étudié ont été déterminés en fonction de la taille de la région amplifiée et de la T_m des amorces utilisées (tableau 09).

Tableau 10. Programme du thermocycleur pour l'amplification des gènes de virulence prospectés.

	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Élongation	Élongation finale	Nombre de cycles
<i>Pap</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	56 °C / 30 sec	72 °C / 120 sec	72 °C / 10 min	30
<i>hlyA</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	60 °C / 30 sec	72 °C / 120 sec	72 °C / 10 min	35
<i>afa/dr</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	62 °C / 30 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 10 min	35
<i>astA</i>	94 °C / 5 min	94 °C / 60 sec	55 °C / 60 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 5 min	35
<i>stx1</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	58 °C / 30 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 10 min	30
<i>stx2</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	58 °C / 30 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 10 min	30
<i>eaeA</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 sec	56 °C / 30 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 10 min	30
<i>ST</i>	96 °C / 5 min	94 °C / 30 sec	53 °C / 30 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 7 min	30
<i>InvE</i>	96 °C / 5 min	94 °C / 30 sec	55 °C / 30 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 7 min	30

La migration des gènes amplifiés s'est faite en ajoutant 5 µl de Clear Sight DNA Strain (Euromedex®) (alternative non cancérigène au BET) pour 100 ml de gel d'agarose à 2% pour l'amplifiant des gènes de moins de 1000 pb et à 1% pour celui de plus de 1000 pb. 10 µl de chaque amplifiant a été déposé sur le gel et a subi une électrophorèse en tampon TBE 1X (Euromedex®) pendant 25 min à 30 V (Mupid®One). Les fragments d'ADN amplifiés ont été révélés aux UV.

La concordance du poids moléculaire des fragments amplifiés avec celui des fragments attendus a été vérifiée grâce à des marqueurs de taille de 100 pb - 1000 pb du Smart Ladder SF (Eurogentec®) et de 200 pb - 1 kb du Smart Ladder SL (Eurogentec®).

3. Étude statistique

L'analyse statistique descriptive a été réalisée à l'aide de SPSS® V21. Toutes les données : sexe, âge, gènes de virulence et les phylogroupes ont été analysés et les associations significatives entre les différentes données ont été réalisées à l'aide du test *Chi-Square*, et le test exact de *Fisher*. La significativité statistique a été fixée à $p < 0,05$.

Résultats

1. Prélèvements obtenus

1.1. Source du prélèvement biologique

Cent soixante-quinze souches d'*Escherichia coli* ont été prélevées au sein du laboratoire de Bactériologie du CHU Benbadis de Constantine (Algérie). Ces souches ont été isolées de patients hospitalisés et ambulatoires d'âge et de sexe différents provenant de différents services. Ces services peuvent avoir deux types d'abréviations. La distribution des prélèvements par service est répartie comme suit :

Traitements Ambulatoires (TA) : 47, Infectieux (Inf)(Ctx) : 23, Chirurgie (Chr)(FA-HA) : 20, Médecine Interne (MI)(FB-HB) : 11, Gastro-Entérologie (G-E) : 10, Hémodialyse (Hmd) : 10, Réanimation (Rea) : 8, Réanimation des Urgences Chirurgicales (RUC) : 6, Gynécologie (Gyn)(Go) : 5, Urgences Chirurgicales (UrCh)(Soa) : 4, Urologie (Uro) : 4, Centre des Brûlés (CBr) : 3, Urgences Médicales (UrMd)(Um) : 3, Pédiatrie (Ped) : 3, Pneumologie (Pnm) : 3, Orthopédie (Ort)(Oa) : 3, Cardiologie (Card) : 3, Centre des Prélèvements (CP) : 2, Neurologie (Neu) : 2, Hématologie (Hmt) : 1, Dermatologie (Der) : 1, Ophtalmologie (Oph) : 1, Protection sanitaire (PS) : 1, Médecine Légale (ML) : 1 (figure 13).

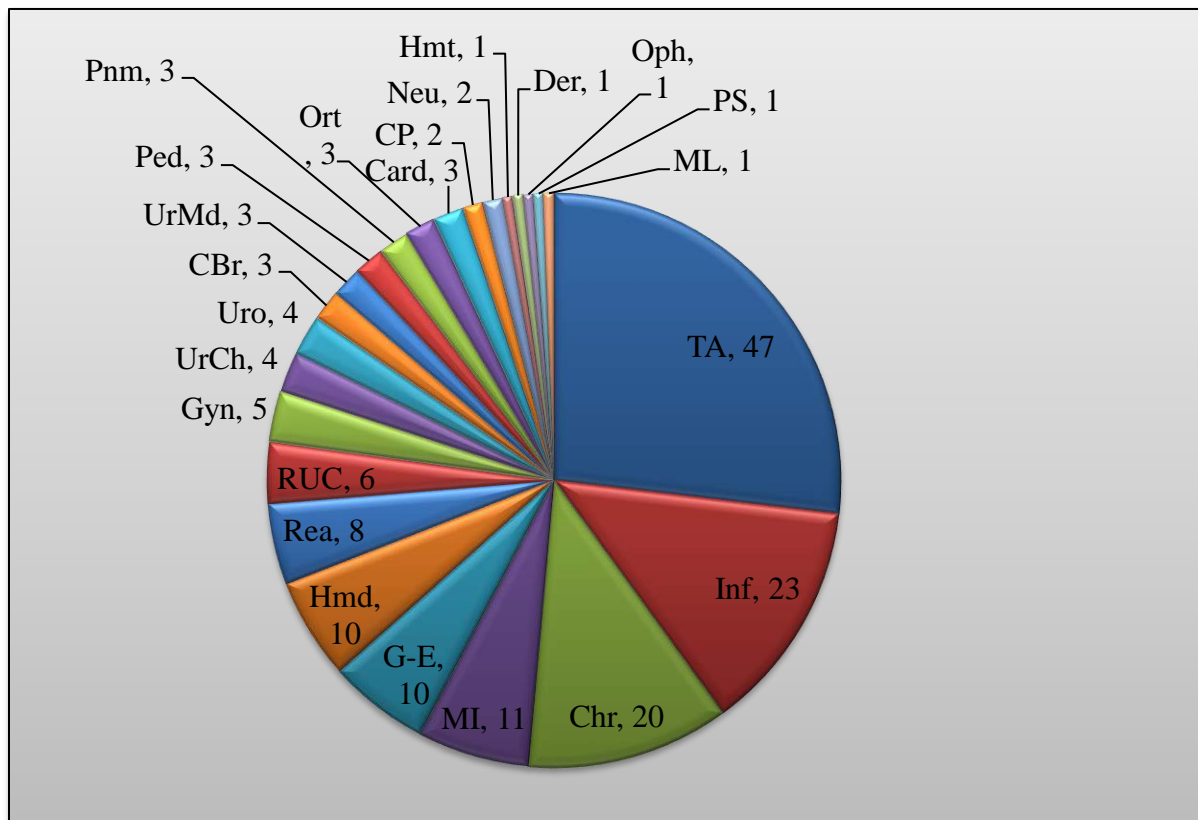


Figure 13. Nombres de prélèvements obtenus par service.

1.2. Nature du prélèvement biologique

Les isolats proviennent de divers prélèvements biologiques et sont à majorité d'origine urinaire et à moindre degré d'origine purulente (pus) comme suit : urines (97), pus (34), sang (18), ponction péritonéale (16), ponction pleurale (10).

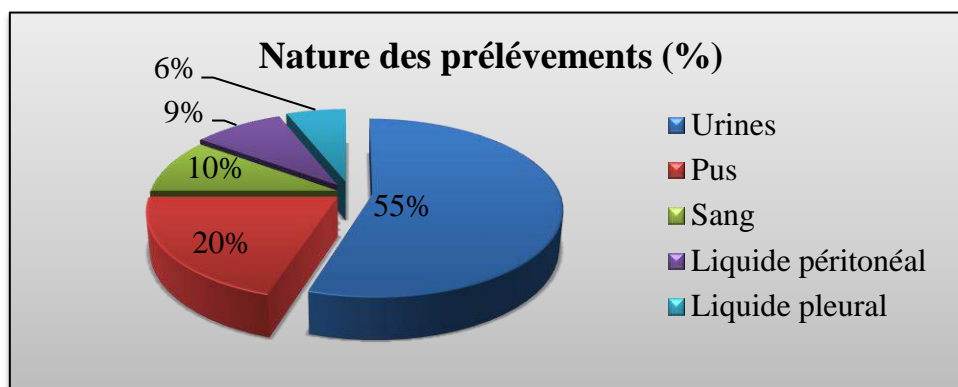


Figure 14. Répartition des souches d'*E. coli* isolées selon la nature biologique du prélèvement.

2. Paramètres cliniques

2.1. Âge du patient

Les prélèvements obtenus ont été classés en catégorie de groupes d'âge, du fait qu'ils proviennent des services de pédiatrie et d'autres services recevant des adultes, jeunes adultes et seniors ainsi que l'ambulatoire avec toutes les tranches d'âge. Les résultats sont les suivants : 0-2 ans (18,28%), 2-10 ans (7,43%), 11-20 ans (6,28%), 21-30 ans (8,57%), 31-40 ans (6,86%), 41-50 ans (12%), 51-60 ans (10,86%), 61-70 ans (8%), 71-80 ans (16%) et 81-90 ans (5,71%).

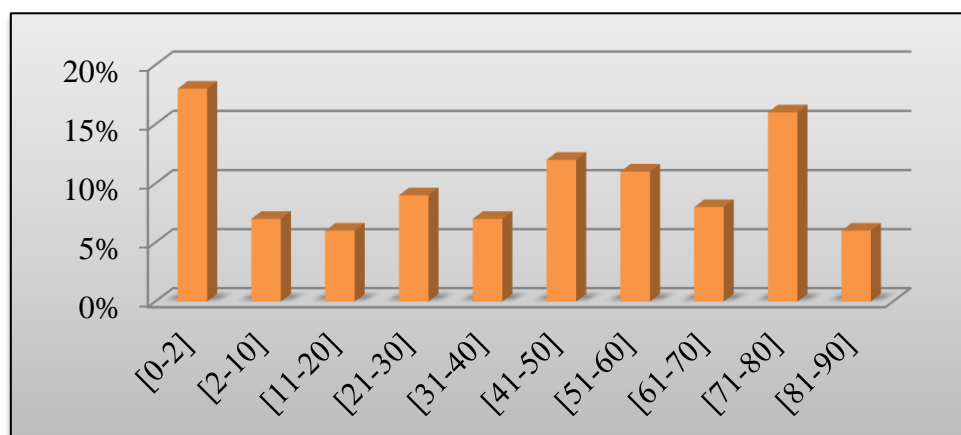


Figure 15. Histogramme représentant la répartition des patients par tranche d'âge.

2.2. Sexe du patient

Sur un total de 175 souches, 106 proviennent de patients de sexe féminin et 69 de sexe masculin.

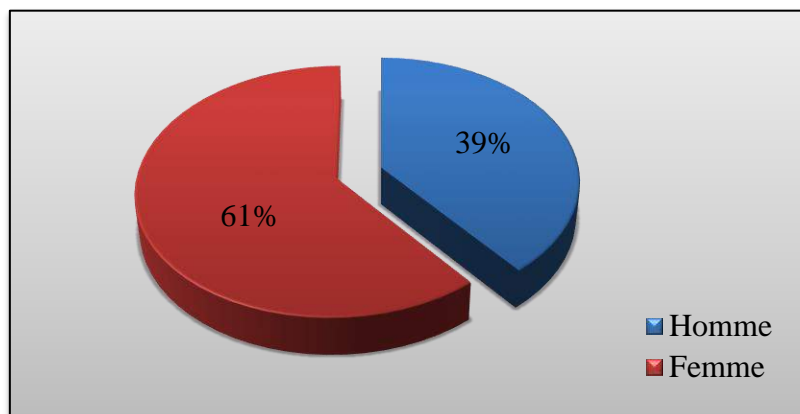


Figure 16. Répartition des souches d'*E. coli* isolées en fonction du sexe des patients.

3. Analyse bactériologique

Les prélèvements ont été répartis en deux groupes ; le premier représente les urines et le second englobe tous les autres prélèvements.

3.1. Identification des *E. coli*

Une première identification macroscopique permet de cibler les souches *E. coli* sur milieu Hektoen, généralement les colonies d'*E. coli* sont moyennes, régulières à bordure nette, plates laissant apparaître en leurs centres une coloration plus foncée d'où le terme « centre ombiliqué », de 2 à 3 mm de diamètre, de couleur saumon. Certaines colonies peuvent être humides et brillantes alors que d'autres sont sèches et mates.



Figure 17. Aspect des colonies d'*E. coli* sur milieu Hektoen.

3.2. Caractérisation biochimique

L'appartenance à l'espèce *E. coli* a été confirmée par des tests biochimiques qui englobent le métabolisme glucidique et protéique de la bactérie. Les résultats attendus et obtenus sont indiqués dans le tableau 11.

Tableau 11. Réactions attendues des différents milieux utilisés pour l'identification biochimique d'*Escherichia coli*.

Milieux		Caractères recherchés	Réactions attendues
Clark et Lubs	RM	Présence d'acides organiques	+
	VP	Production d'AMC	-
ONPG		Présence de la β -galactosidase	+
Citrate de Simmons		Utilisation du Citrate	-
TSI	Fermentation du Glucose		+
	Utilisation du Lactose + Saccharose		+
	Production du H ₂ S		+
Mannitol-Mobilité	Fermentation du Mannitol		+
	Mobilité de la souche		+
Urée-Indole	Présence d'Uréase		-
	Production d'Indole		+
Catalase		Production de la catalase	+

Néanmoins il existe quelques rares souches qui ne répondent pas au profil du tableau ci-dessus, mais qui sont identifiées et référencées comme étant bel et bien des souches *E. coli* si l'étude macroscopique des colonies ainsi que les autres critères biochimiques sont validés. Parmi les critères qui peuvent varier ; la mobilité.

4. *Escherichia coli* issues d'infections urinaires

4.1. Paramètres cliniques

4.1.1. Âge du patient

L'âge moyen était de 55.84 ans ; 51,6 ans pour les femmes et 60,08 ans pour les hommes. Sur le total des 97 souches, 22.68% (n = 22) provenaient de nourrissons de moins de 2 ans. Les résultats des autres tranches d'âge sont les suivants : 2-10 ans (4,12%), 11-20 ans (4,12%), 21-30 ans (6,19%), 31-40 ans (7,22%), 41-50 ans (9,28%), 51-60 ans (12,37%), 61-70 ans (9,28%), 71-80 ans(17,53%) et 81-90 ans (7,22%),

4.1.2. Sexe du patient

Sur les 97 souches, 64,95% (n = 63) provenaient de femmes et 35,05% (n = 34) d'hommes atteints d'infection urinaire.

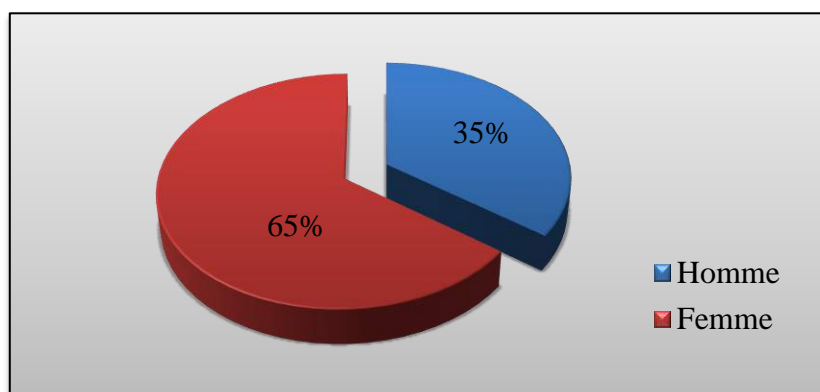


Figure 18. Répartition des souches d'*E. coli* isolées d'infections urinaires en fonction du sexe des patients.

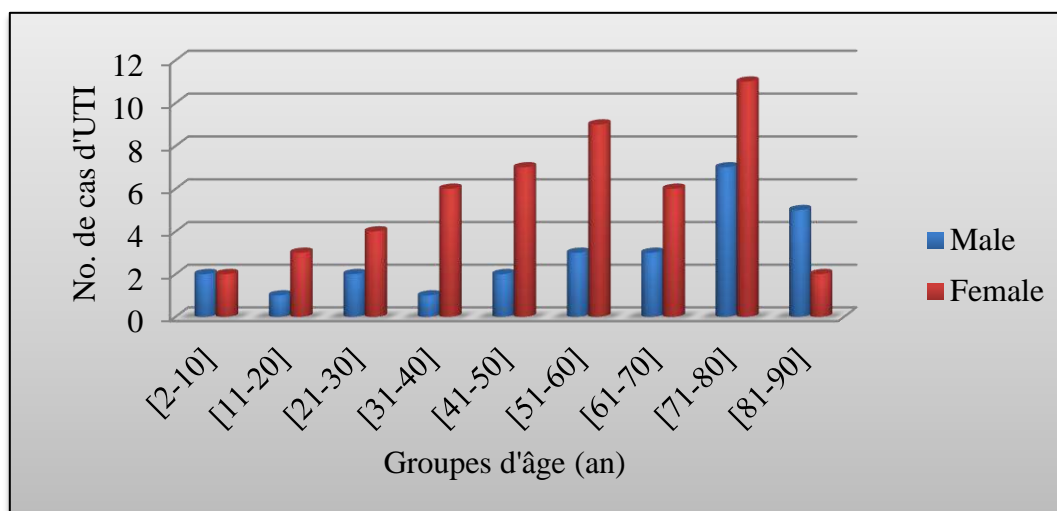


Figure 19. Distribution des groupes d'âge et du sexe des patients atteints d'infections urinaires.

4.2. Examen cytobactériologique

Parmi un total de 352 échantillons d'urine provenant de patients présentant des symptômes urologiques d'infection urinaire (urgence urinaire, incontinence par impériosité, dysurie, vessie douloureuse, douleur au flanc, douleur dorsale et pour les enfants de moins de 2 ans : fièvre, diarrhée, vomissements, ictère léger et autres symptômes non-spécifiques), 97 échantillons ont été considérés positifs à une infection urinaire par *E. coli* et identifiées par examen cytobactériologique puis confirmées par tests biochimiques.

- **Aspect de l'urine :** habituellement jaune plus ou moins foncée et est transparente. Lors d'infections, l'urine peut être trouble, claire, purulente ou hémorragique.
- **Examen microscopique :** dans une urine saine, il y a essentiellement des globules rouges (hématies), des globules blancs (leucocytes), des cellules épithéliales et peut y avoir des germes. La détection sous microscope de ces éléments ne signifie pas forcément une infection.
- **Dénombrement :** on parle d'une infection urinaire lorsque la leucocyturie est supérieure à $>10^4$ /ml et la bactériurie dépasse le seuil de $>10^3$ /ml pour *E. coli*.

4.3. Détermination de la résistance aux antibiotiques (antibiogramme)

Tous les isolats d'*E. coli* ont été soumis au même test de sensibilité aux antibiotiques et dans les mêmes conditions.

Les résultats de l'antibiorésistance ont révélé une résistance plus élevée pour l'amoxicilline et la ticarcilline à égalité (85,6%) suivies par la pipéracilline (83,5%), l'amoxicilline-clavulanate (69,1%), triméthoprine-sulfaméthoxazole (45,4%). Les résistances les plus faibles étaient de 2,1% pour l'imipénem et de 1% pour la colistine (tableau 12).

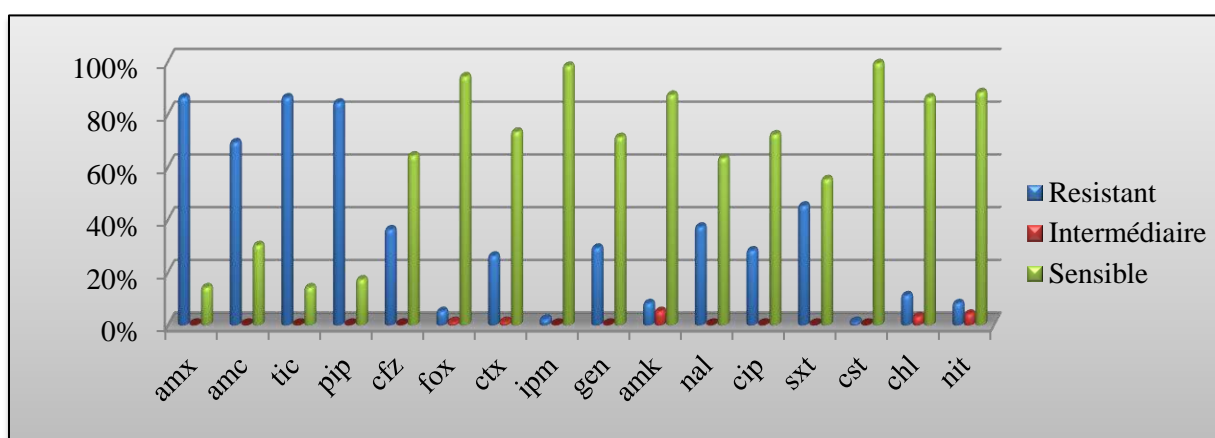


Figure 20. Histogramme des profils de résistance aux antibiotiques des isolats d'*E. coli* provenant de patients atteints d'infection urinaire.

Dans cette étude, 72,2 % (n = 70) des isolats étaient considérés comme des souches multirésistantes (MDR). Dix isolats étaient sensibles à tous les antibiotiques étudiés. Des isolats résistants à tous les antibiotiques étudiés n'ont pas été observés.

Tableau 12. Profils de résistance aux antibiotiques des isolats d'*E. coli* provenant de patients atteints d'infection urinaire.

Antibiotiques	Résistants		Intermédiaires		Sensibles	
	No	%	No	%	No	%
Amoxicilline (amx)	83	85,6	0		14	14,4
Amoxicilline-Ac clavulanique (amc)	67	69,1	1	1	29	29,9
Ticarcilline (tic)	83	85,6	0		14	14,4
Piperacilline (pip)	81	83,5	0		16	16,5
Cefazoline (cfz)	35	36,1	0		62	63,9
Cefoxitine (fox)	5	5,2	1	1	91	93,8
Cefotaxime (ctx)	25	25,8	1	1	71	73,2
Imipenem (ipm)	2	2,1	0		95	97,9
Gentamycine (gen)	28	28,9	0		69	71,1
Amikacine (amk)	8	8,2	5	5,2	84	86,6
Ac nalidixique (nal)	36	37,1	0		61	62,9
Ciprofloxacine (cip)	27	27,8	0		70	72,2
Sulfamethoxazole-Trimethoprim (sxt)	44	45,4	0		53	54,6
Colistine (cst)	2	2,1	0		95	97,9
Chloramphenicol (chl)	11	11,3	3	3,1	83	85,6
Nitrofurantoïne (nit)	8	8,2	4	4,1	85	87,6

4.4. Étude moléculaire

4.4.1. Profil phylogénétique

Le groupe phylogénétique prédominant dans notre étude était B2 (45,36%) suivi de D (12,37%), B1 (11,34%), E (9,28%), C (8,25%), F (3,09%) et A (1,03%). Il a été observé que pour 9,28% des isolats, le phylogroupage donnait des résultats inconnus (inclassables).

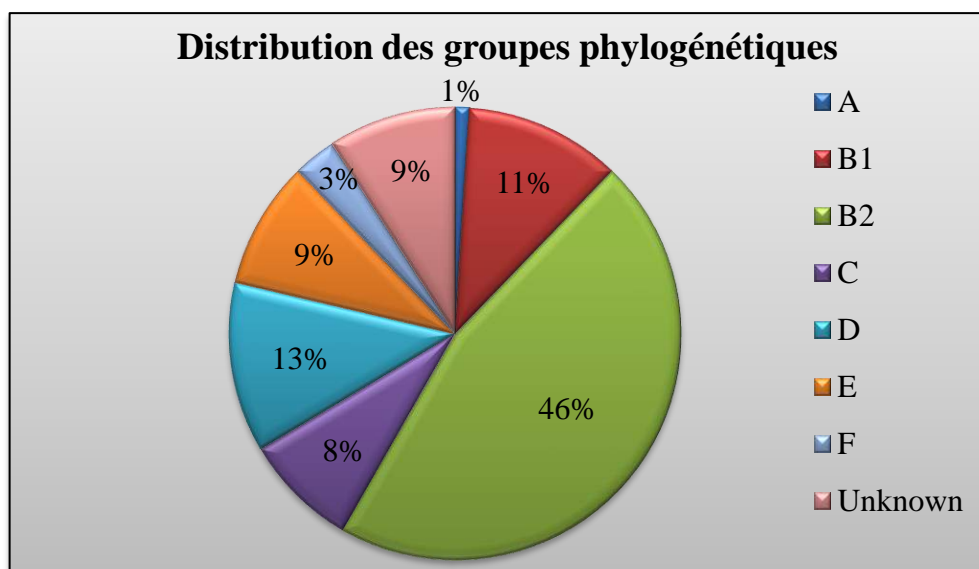


Figure 21. Répartition des groupes phylogénétiques des souches *E. coli* issues d'infections urinaires.

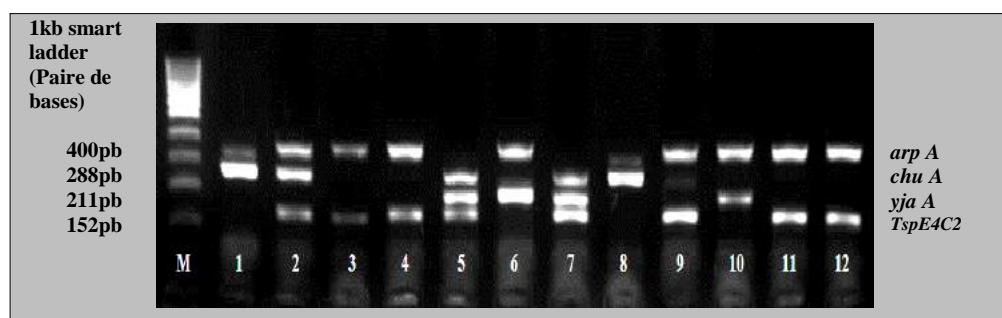


Figure 22. Profils des phylogroupes sur électrophorèse sur gel d'agarose des souches 1 à 12 étudiées. (M; 1kb smart ladder, 1-12; résultats de la PCR). Gènes du phylogroupe ; *arpA* (400pb), *chuA* (288 pb), *yjaA* (211 pb), *TspE4C2* (152 pb).

4.4.2. Prévalence des gènes de virulence

Dans nos échantillons étudiés, 84,54% des isolats possédaient au moins un des gènes de virulence prospectés, tandis que 15,46% ne présentaient aucun de ces gènes. Le gène *astA* a été détecté avec la prévalence la plus élevée (47,42%), suivi de *hlyA* (41,24%), la fréquence la plus faible était celle du gène *invE* avec 4,12%. Les gènes *stx1*, *stx2*, *eaeA* et *ST1* étaient négatifs pour toutes les souches étudiées (tableau 13).

Tableau 13. Prévalence des gènes de virulence des *E. coli* issues d'infections urinaires.

Gènes	Total des souches (n=97)	
	No	%
<i>astA</i>	46	47,42
<i>hlyA</i>	40	41,24
<i>pap</i>	35	36,08
<i>afa</i>	24	24,74
<i>invE</i>	4	4,12
<i>stx1</i>	0	0
<i>stx2</i>	0	0
<i>eaeA</i>	0	0
<i>ST1</i>	0	0

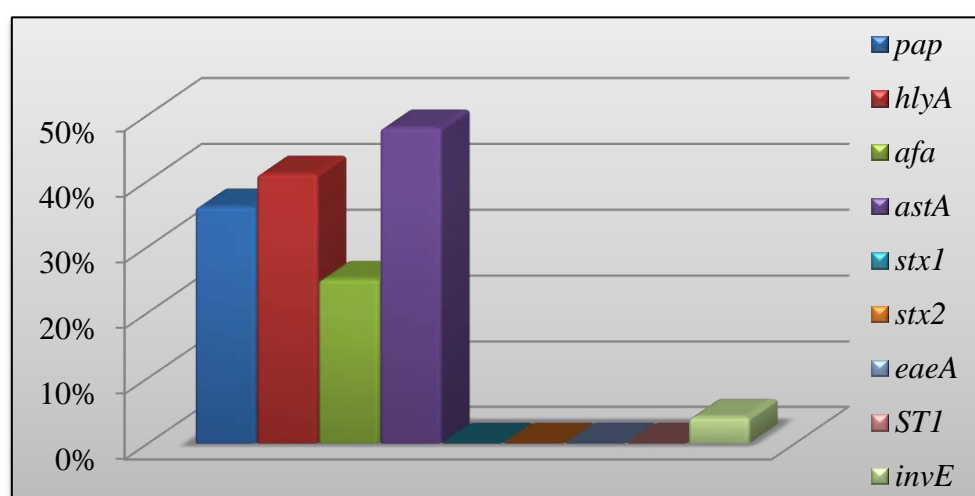


Figure 23. Histogramme représentant la prévalence des gènes de virulence des *E. coli* issues d'infections urinaires.

4.4.3. Prévalence des gènes de virulence chez les patients ambulatoires et hospitalisés

Le nombre de souches UPEC isolées était plus élevé chez les patients hospitalisés 63,92% (n=62) que chez les patients ambulatoires 36,08% (n=35). Les résultats ont révélé une association significative entre *E. coli* provenant de patients hospitalisés ayant des infections urinaires et les gènes *pap* et *hlyA* ($p=0,041$ et $p=0,019$ respectivement) (tableau 14).

Tableau 14. Prévalence des gènes de virulence de *E. coli* issues d'infections urinaires chez les patients hospitalisés et ambulatoires.

Gène		Souches de patients hospitalisés (n=62)	Souches de patients ambulatoires (n=35)	X ²	p-value
<i>astA</i>	Présent	27	19	1,03	0,309
	Absent	35	16		
<i>hlyA</i>	Présent	31	9	5,45	0,019
	Absent	31	23		
<i>pap</i>	Présent	27	8	4,15	0,041
	Absent	35	27		
<i>afa</i>	Présent	15	9	0,03	0,867
	Absent	47	26		
<i>invE</i>	Présent	3	1	0,22	0,637
	Absent	59	34		

4.4.4. Profil phénotypique des gènes de virulence

Parmi 97 souches, le profil le plus fréquemment détecté était *astA*⁺ dans 13 souches suivi des associations à deux gènes *pap*⁺*hlyA*⁺ détectées dans 12 souches et *hlyA*⁺*astA*⁺ sur 11 souches, *pap*⁺*astA*⁺ et *afa*⁺*astA*⁺ ont été trouvés dans 5 souches. L'association de trois gènes *pap*⁺*hlyA*⁺*astA*⁺ a été trouvée dans 6 souches et *hlyA*⁺*afa*⁺*astA*⁺ dans 2. Une seule a montré la présence de 5 gènes *pap*⁺*hlyA*⁺*afa*⁺*astA*⁺*invE*⁺ (tableau 15).

Tableau 15. Profil phénotypique des gènes de virulence des *E. coli* issues d'infections urinaires.

Profils des gènes de virulence	No. de gènes	No. de souches (n = 97)	
		No	%
Absence de gène	0	15	15,5
<i>pap</i> ⁺	1	7	7,2
<i>hlyA</i> ⁺	1	3	3,1
<i>afa</i> ⁺	1	10	10,3
<i>astA</i> ⁺	1	13	13,4
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺	2	12	12,4
<i>pap</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺	2	2	2,1
<i>pap</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	2	5	5,2
<i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺	2	1	1
<i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	2	11	11,3
<i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	2	5	5,2
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	3	6	6,2
<i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	3	2	2,1
<i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	3	1	1
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	4	1	1
<i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	4	1	1
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	4	1	1
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	5	1	1

4.4.5. Distribution des gènes de virulence en fonction du groupe phylogénétique

Dans le phylogroupe B2, la prévalence des gènes de virulence était significativement plus élevée, avec une fréquence de 95,5% au sein des souches possédant au moins un gène de virulence ($p=0,006$) (tableau 16). Le même phylogroupe a montré une association significative avec les trois gènes de virulence *pap*, *hlyA* et *invE* ($p=0,002$, $p=0,001$ et $p=0,025$ respectivement) (tableau 17).

De plus, il y avait une association significative, présentée dans le tableau B, entre les gènes B1 et *pap*, *hlyA* ($p=0,049$ et $p=0,021$ respectivement) ; E et le gène *afa* ($p=0,024$), ainsi que les souches inclassables avec le gène *astA* ($p=0,008$).

Tableau 16. Répartition des groupes phylogénétiques avec au moins un gène de virulence.

Groupe phylogénétique	Souches avec au moins un gène de virulence		Souches sans gène de virulence		X ²	p-value
	No	%	No	%		
A	1	100	0	0	0.18	0.667
B1	5	45.5	6	54.5	14.50	0.0001
B2	42	95.5	2	4.5	7.34	0.006
C	6	75	2	25	0.61	0.436
D	8	66.7	4	33.3	3.34	0.067
E	8	88.9	1	11.1	0.14	0.704
F	3	100	0	0	0.57	0.451
Inconnu	9	100	0	0	1.81	0.177

4.4.6. Détection d'hybride ExPEC/InPEC obtenus à partir de patients atteints d'infections urinaires

Quatre souches hybrides ExPEC/InPEC ont été détectées dans les urines, toutes portaient le gène *invE*. L'ensemble de ces souches étaient associées au gène *hlyA*, leurs associations avec des marqueurs de virulence ExPEC typiques leur confèrent le statut d'hybrides. L'origine phylogénétique de ces hybrides est la même, elles appartiennent au phylogroupe B2 (tableau 18).

Tableau 18. Souches hybrides ExPEC/InPEC obtenues à partir de patients atteints d'infections urinaires

Hybride ExPEC/InPEC Identifiant	phylogroupe	InPEC marqueurs	ExPEC marqueurs		ExPEC/InPEC marqueurs	
		<i>invE</i>	<i>pap</i>	<i>hlyA</i>	<i>afa</i>	<i>astA</i>
42	B2	+	+	+	+	+
75	B2	+	-	+	+	+
138	B2	+	-	+	-	+
151	B2	+	+	+	+	-

Tableau 17. Association entre les gènes de virulence et les groupes phylogénétiques.

Phylogroupe		Gène de virulence																			
		<i>astA</i>				<i>hlyA</i>				<i>pap</i>				<i>afa</i>				<i>invE</i>			
		Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value
A	Présent	1	0	1,12	0,289	0	1	0,71	0,399	0	1	0,57	0,450	0	1	0,33	0,564	0	1	0,04	0,834
	Absent	45	51			40	56			35	61			24	72			4	92		
B1	Présent	5	6	0,02	0,889	1	10	5,29	0,021	0	11	3,86	0,049	1	10	1,63	0,201	0	11	0,53	0,465
	Absent	41	45			39	47			23	63			23	63			4	82		
B2	Présent	20	24	0,13	0,723	26	18	10,59	0,001	23	21	9,15	0,002	11	33	0,00	0,957	4	40	5,03	0,025
	Absent	26	27			14	39			12	41			13	40			0	53		
C	Présent	4	4	0,02	0,878	1	7	2,97	0,084	1	7	2,10	0,147	1	7	0,70	0,363	0	8	0,38	0,540
	Absent	42	47			39	50			34	55			23	66			4	85		
D	Présent	3	9	2,76	0,096	4	8	0,35	0,552	2	10	2,24	0,134	4	8	0,54	0,461	0	12	0,59	0,442
	Absent	43	42			36	49			33	52			20	65			4	81		
E	Présent	3	6	0,79	0,374	3	6	0,23	0,631	4	5	0,30	0,583	5	4	5,06	0,024	0	9	0,43	0,513
	Absent	43	45			37	52			31	57			19	69			4	84		
F	Présent	2	1	0,46	0,497	0	3	2,17	0,140	2	1	1,26	0,262	0	3	1,02	0,313	0	3	0,13	0,715
	Absent	44	50			40	54			33	61			24	70			4	90		
Inclassable	Présent	8	1	6,84	0,008	5	4	0,84	0,359	3	6	0,03	0,856	2	7	0,03	0,854	0	9	0,43	0,513
	Absent	38	50			35	53			32	56			22	66			4	84		

5. *Escherichia coli* issues de diverses infections extra-intestinales

Dans notre étude, la collecte successive d'*E. coli* à partir de différentes infections extra-intestinales a abouti à une proportion plus élevée de souches issues du pus par rapport aux autres prélèvements.

5.1. Paramètres cliniques

5.1.1. Âge du patient

Sur la totalité des 78 souches issues de diverses infections, les résultats des tranches d'âge sont les suivants : 0-2 ans (12,82%), 2-10 ans (11,54%), 11-20 ans (8,97%), 21-30 ans (11,54%), 31-40 ans (6,41%), 41-50 ans (15,38%), 51-60 ans (8,97%), 61-70 ans (6,41%), 71-80 ans (14,10%) et 81-90 ans (3,85%) (figure 24).

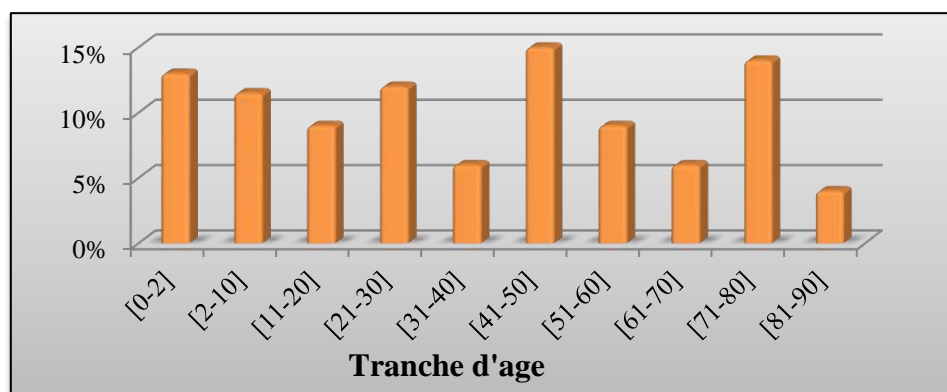


Figure 24. Histogramme représentant la répartition des patients atteints de différentes infections par tranche d'âge.

5.1.2. Sexe du patient

Sur les 78 souches, 55,13% (n = 43) provenaient de femmes et 44,87% (n = 35) d'hommes.

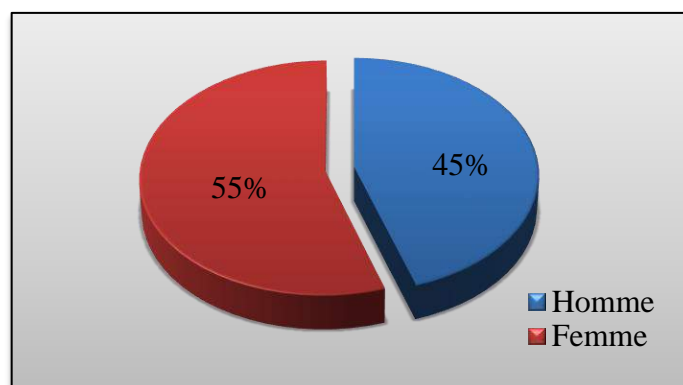


Figure 25. Répartition des souches d'*E. coli* isolées de différentes infections en fonction du sexe des patients.

5.2. Détermination de la résistance aux antibiotiques (antibiogramme)

L'antibiogramme a montré que la résistance la plus élevée était à l'amoxicilline (74,4%) suivie de près par la ticarcilline et la piperacilline, les deux à 73,1%, et amoxicilline-ac clavulanique à 62,8%. Les résultats ont révélé aussi une sensibilité totale à la colistine, l'imipenem à 96,2% suivie de l'amikacine et la nitrofurantoïne à 92,3% (tableau 19).

Tableau 19. Profils de résistance aux antibiotiques des isolats d'*E. coli* provenant de patients atteints de différentes infections.

Antibiotique	Résistant		Intermédiaire		Sensible	
	No	%	No	%	No	%
Amoxicilline (amx)	58	74,4	0		20	25,6
Amoxicilline-Ac clavulanique (amc)	49	62,8	1	1,3	28	35,9
Ticarcilline (tic)	57	73,1	0		21	26,9
Piperacilline (pip)	57	73,1	0		21	26,9
Cefazoline (cfz)	43	55,1	0		35	44,9
Cefoxitine (fox)	6	7,7	0		72	92,3
Cefotaxime (ctx)	27	34,6	0		51	65,4
Imipenem (ipm)	3	3,8	0		75	96,2
Gentamycine (gen)	16	20,5	0		62	79,5
Amikacine (amk)	3	3,8	3	3,8	72	92,3
Ac nalidixique (nal)	36	46,2	1	1,3	41	52,6
Ciprofloxacine (cip)	25	32,1	8	10,3	45	57,7
Sulfamethoxazole-Trimethoprim (sxt)	40	51,3	0		38	48,7
Colistine (cst)	0	0	0		78	100
Chloramphenicol (chl)	12	15,4	0		66	84,6
Nitrofurantoïne (nit)	4	5,1	2	2,6	72	92,3

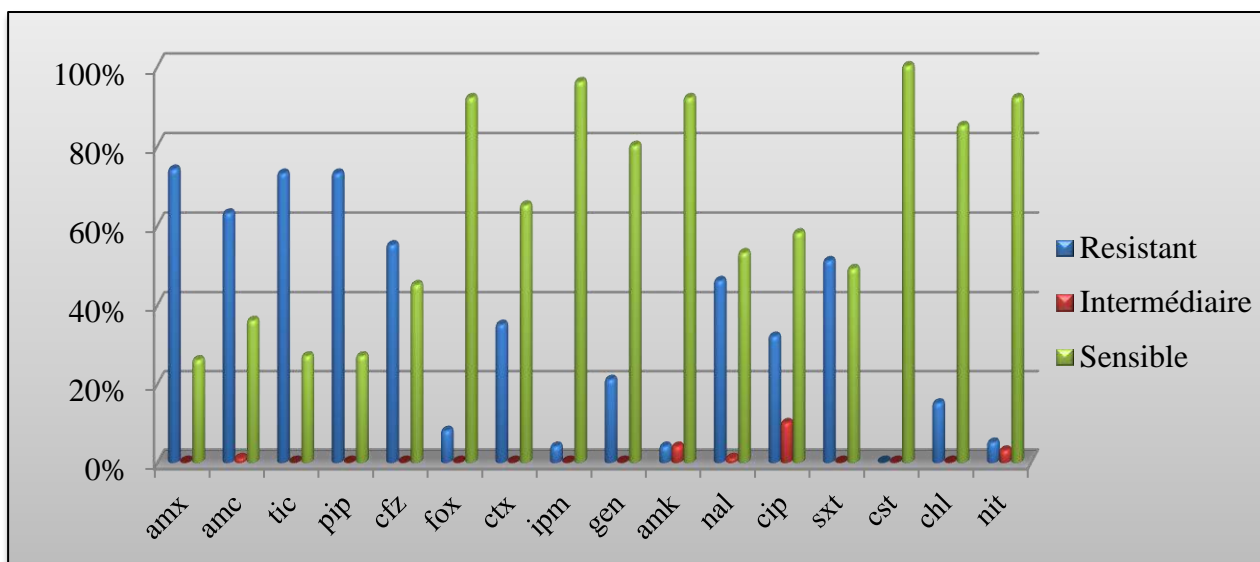


Figure 26. Histogramme des profils de résistance aux antibiotiques des isolats d'*E. coli* provenant de patients atteints de différentes infections.

5.3. Étude moléculaire

5.3.1. Profil phylogénétique

Le groupe phylogénétique prédominant dans notre étude était B2 (28,21%) suivi de B1 (19,23%), E (12,82%), F (8,97%), C (8,97%), A (6,41%), D (6,41%) et le *E. clades* (2,56%). Il a été observé que pour 6,41% des isolats, le phylogroupage donnait des résultats inconnus.

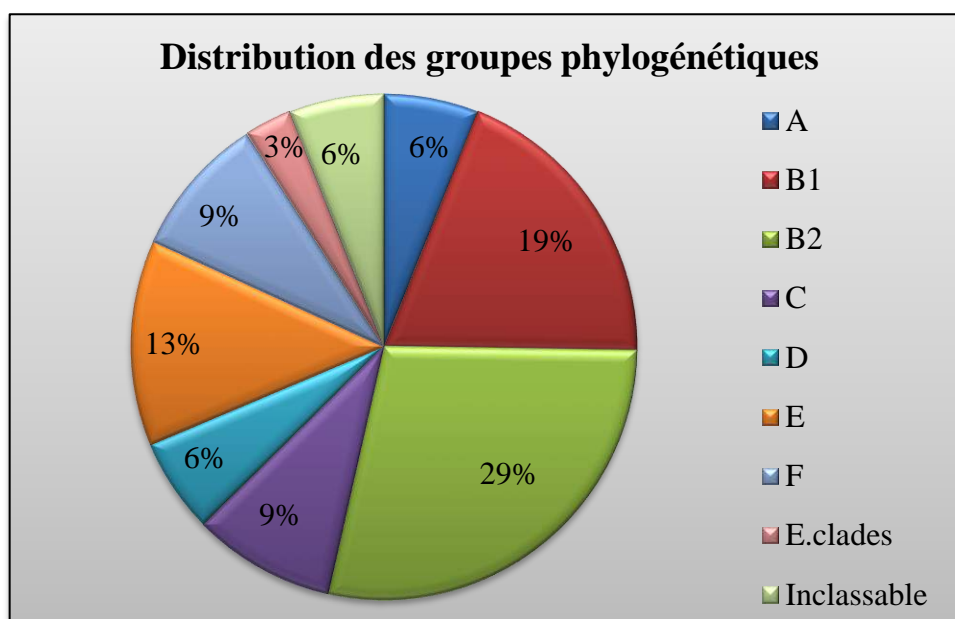


Figure 27. Répartition des groupes phylogénétiques des souches *E. coli* issues de différentes infections extra-intestinales.

5.3.2. Prévalence des gènes de virulence

Dans notre échantillon d'étude, 58,97% des isolats avaient au moins un des gènes de virulence prospectés, tandis que 41,03% ne présentaient aucune présence de ces gènes. Le gène *pap* a été détecté avec la prévalence la plus élevée (30,77%), suivi de l'*astA* (29,49%). La fréquence la plus faible était celle du gène *eaeA* avec 6,41%. Les gènes *stx1*, *stx2* et *ST1* étaient négatifs pour toutes les souches étudiées (tableau 20).

Tableau 20. Prévalence des gènes de virulence des *E. coli* issues de différentes infections extra-intestinales.

Gènes	Total des souches (n=78)	
	No	%
<i>pap</i>	24	30.77
<i>astA</i>	23	29.49
<i>hlyA</i>	11	14.10
<i>invE</i>	6	7.69
<i>afa</i>	6	7.69
<i>eaeA</i>	5	6.41
<i>stx1</i>	0	0
<i>stx2</i>	0	0
<i>ST1</i>	0	0

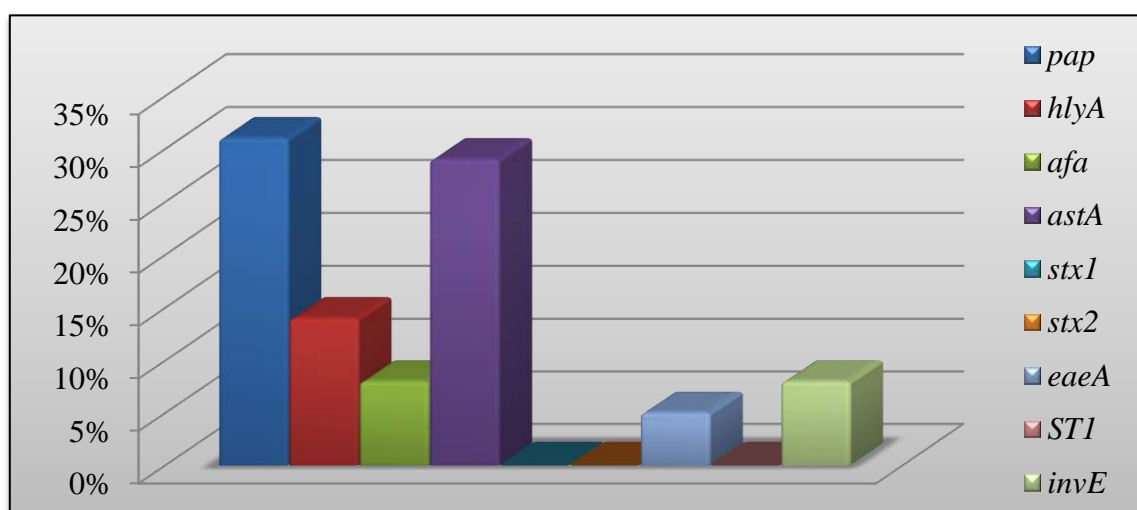


Figure 28. Histogramme représentant la prévalence des gènes de virulence des *E. coli* issues de différentes infections extra-intestinales.

5.3.3. Prévalence des gènes de virulence chez les patients ambulatoires et hospitalisés

Le nombre de souches *E. coli* isolées de différentes infections était nettement plus élevé chez les patients hospitalisés 84,62% (n=66) que chez les patients ambulatoires 15,38% (n=12). Les résultats n'ont révélé qu'une association significative entre *E. coli* provenant de patients ambulatoires et le gène *eaeA* ($p=0,023$) (tableau 21).

Tableau 21. Prévalence des gènes de virulence de *E. coli* issues de différentes infections extra-intestinales chez les patients hospitalisés et ambulatoires.

Gène		Souches de patients hospitalisés (n=66)	Souches de patients ambulatoires (n=12)	X ²	p-value
<i>pap</i>	Présent	20	4	0,04	0,539
	Absent	46	8		
<i>hlyA</i>	Présent	9	2	0,08	0,536
	Absent	57	10		
<i>afa</i>	Présent	6	0	1,18	0,353
	Absent	60	12		
<i>astA</i>	Présent	18	5	1,01	0,248
	Absent	48	7		
<i>eaeA</i>	Présent	2	3	8,17	0,023
	Absent	64	9		
<i>invE</i>	présent	4	2	1,61	0,228
	Absent	62	10		

5.3.4. Profil phénotypique des gènes de virulence

Parmi les 78 souches étudiées, le profil le plus fréquemment détecté était *astA*⁺ dans 10 souches. L'association à deux gènes la plus représentée était *pap*⁺*hly*⁺ retrouvée dans 9 souches, suivies de l'association *astA*⁺*pap*⁺ dans 5 souches. Trois profils d'associations à trois gènes *pap*⁺*astA*⁺*invE*⁺, *hlyA*⁺*astA*⁺*invE*⁺ et *astA*⁺*eaeA*⁺*invE*⁺ ont été trouvés dans une souche chacun. Le plus grand nombre d'associations de gènes était de quatre *pap*⁺*hlyA*⁺*astA*⁺*invE*⁺, retrouvé une seule souche issue du sang (tableau 22).

De plus, les résultats ont révélé deux associations significatives, représentées dans le tableau 23, entre le gène *afa* et le pus ($p=0,005$) et entre le gène *invE* et le sang ($p=0,023$).

Tableau 22. Profils phénotypiques des gènes de virulence des *E. coli* issues de différentes infections extra-intestinales.

Profils des gènes de virulence	No. de gènes	Distribution dans les différents échantillons biologiques	No. de souches (n = 78)	
			No	%
Absence de gène	0	17 pus, 4 sang, 4 liquide péritonéal, 6 fluide pleural	31	39,74
<i>astA</i> ⁺	1	4 pus, 2 sang, 3 liquide péritonéal, 1 fluide pleural	10	12,82
<i>pap</i> ⁺	1	3 pus, 2 sang, 2 liquide péritonéal	7	8,97
<i>afa</i> ⁺	1	2 pus, 3 sang, 1 liquide péritonéal	6	7,69
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺	2	3 pus, 2 sang, 2 liquide péritonéal, 2 fluide pleural	9	11,53
<i>pap</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	2	1 pus, 3 liquide péritonéal, 1 fluide pleural	5	6,41
<i>pap</i> ⁺ <i>eae</i> ⁺	2	1 pus, 1 liquide péritonéal	2	2,56
<i>astA</i> ⁺ <i>eae</i> ⁺	2	1 pus, 1 sang	2	2,56
<i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	2	1 pus, 1 sang	2	2,56
<i>pap</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	3	1 sang	1	1,28
<i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	3	1 pus	1	1,28
<i>astA</i> ⁺ <i>eae</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	3	1 sang	1	1,28
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	4	1 sang	1	1,28

Tableau 23. Association entre les gènes de virulence et les divers prélèvements cliniques.

Gènes		Type du prélèvement															
		Pus				Sang				Liquide péritonéal				Fluide pleural			
		Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value
<i>pap</i>	Présent	8	16	1,48	0,166	6	18	0,07	0,501	8	16	3,49	0,061	4	20	0,46	0,366
	Absent	26	28			12	42			8	46			6	48		
<i>hlyA</i>	Présent	4	7	0,27	0,427	3	8	0,13	0,491	2	9	0,04	0,599	2	9	0,33	0,429
	Absent	30	37			15	52			14	53			8	59		
<i>afa</i>	Présent	6	0	8,41	0,005	3	3	2,65	0,131	1	5	0,06	0,642	0	6	0,96	0,426
	Absent	28	44			15	57			15	57			10	62		
<i>astA</i>	Présent	7	16	2,30	0,102	7	16	0,99	0,238	6	17	0,62	0,308	2	21	0,50	0,384
	Absent	27	28			11	44			10	45			8	47		
<i>eaeA</i>	Présent	2	3	0,03	0,622	2	3	0,86	0,325	1	4	0,00	0,729	1	4	0,25	0,506
	Absent	32	41			16	57			15	58			9	64		
<i>invE</i>	Présent	2	4	0,28	0,467	4	2	6,96	0,023	0	6	1,68	0,239	0	6	0,96	0,426
	Absent	32	40			14	58			16	56			10	62		

5.3.5. Distribution des gènes de virulence dans les groupes phylogénétiques

Dans le tableau 24, les résultats obtenus révèlent une association significative entre le phylogroupe B2 et les gènes *pap* et *hlyA* ($p=0,005$ et $p=0,001$ respectivement), ainsi qu'entre le phylogroupe E et le gène *afa* ($p=0,025$). Les données ont également montré une relation significative entre le groupe inconnu et trois gènes de virulence *astA*, *eaeA* et *invE* ($p=0,024$, $p=0,001$ et $p=0,002$ respectivement).

Tableau 24. Association entre les gènes de virulence et les groupes phylogénétiques de souches d'*E. coli* issues de diverses infections extra-intestinales.

Phylogroupes		Gènes de virulence																							
		<i>pap</i>				<i>hlyA</i>				<i>afa</i>				<i>astA</i>				<i>eaeA</i>				<i>invE</i>			
		Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value	Présent	Absent	X ²	P-value
A	Présent	1	4	0,29	0,5093	0	5	0,88	0,457	0	5	0,45	0,662	2	3	0,28	0,463	0	5	0,37	0,711	0	5	0,45	0,662
	Absent	23	50			11	62			6	67			21	52			5	68			6	67		
B1	Présent	4	11	0,15	0,481	2	13	0,01	0,645	0	15	1,55	0,264	3	12	0,80	0,287	1	14	0,00	0,667	1	14	0,03	0,675
	Absent	20	43			9	54			6	57			20	43			4	59			5	58		
B2	Présent	12	10	8,13	0,005	8	14	12,54	0,001	2	20	0,08	0,546	4	18	1,88	0,135	0	22	2,10	0,180	2	20	0,08	0,546
	Absent	12	44			3	53			4	52			19	37			5	51			4	52		
C	Présent	1	6	0,98	0,301	0	7	1,26	0,329	0	7	0,64	0,557	2	5	0,00	0,662	0	7	0,53	0,616	0	7	0,64	0,557
	Absent	23	48			11	60			6	65			21	50			5	66			6	65		
D	Présent	1	4	0,29	0,509	0	5	0,88	0,457	1	4	1,14	0,337	1	4	0,23	0,536	0	5	0,37	0,711	0	5	0,45	0,662
	Absent	23	50			11	62			5	68			22	51			5	68			6	67		
E	Présent	2	8	0,62	0,348	0	10	1,88	0,197	3	7	8,04	0,025	4	6	0,61	0,330	0	10	0,79	0,493	0	10	0,96	0,426
	Absent	22	46			11	57			3	65			19	49			5	63			6	62		
F	Présent	1	6	0,98	0,301	1	6	0,00	0,670	0	7	0,64	0,557	2	5	0,00	0,662	0	7	0,53	0,616	0	7	0,64	0,557
	Absent	23	48			10	61			6	65			21	50			5	66			6	65		
E. clades	Présent	0	2	0,91	0,476	0	2	0,34	0,736	0	2	0,17	0,851	1	1	0,42	0,505	1	1	6,50	0,124	0	2	0,17	0,851
	Absent	24	52			11	65			6	70			22	54			4	72			6	70		
Inclassable	Présent	2	3	0,21	0,490	0	5	0,88	0,457	0	5	0,45	0,662	4	1	6,56	0,024	3	2	25,57	0,001	3	2	20,59	0,002
	Absent	22	51			11	62			6	67			19	54			2	71			3	70		

5.3.6. Détection d'hybride ExPEC/InPEC obtenus à partir de patients atteints de diverses infections extra-intestinales

La prospection de souches hybrides dans les prélèvements de diverses infections extra-intestinales à *E. coli* en a révélée dix. Cinq d'entre elles portaient le gène *invE*, quatre souches portaient le gène *eaeA* et une seule souche comprenait à la fois *invE* et *eaeA*. Sur l'ensemble de ces souches, huit étaient associées au gène *astA*. De plus, cinq hybrides ont été détectés dans les échantillons de sang, quatre dans le pus et un seul dans le liquide péritonéal.

L'origine phylogénétique de ces hybrides diffère, cinq d'entre eux appartiennent au groupe inconnu (inclassable), deux au B1, deux au B2 et un au *E. clades* (tableau 25).

Tableau 25. Souches hybrides ExPEC/InPEC obtenues à partir de patients atteints de diverses infections extra-intestinales.

Hybride ExPEC/InPEC Identifiant	Type du prélèvement	phylogroupe	InPEC marqueurs		ExPEC marqueurs		ExPEC/InPEC marqueurs	
			<i>eaeA</i>	<i>invE</i>	<i>pap</i>	<i>hlyA</i>	<i>afa</i>	<i>astA</i>
15	Pus	Inclassable	-	+	-	-	-	+
32	Pus	B1	-	+	-	+	-	+
36	Liquide péritonéal	Inclassable	+	-	+	-	-	-
52	Sang	Inclassable	+	+	-	-	-	+
85	Pus	B1	+	-	+	-	-	-
86	Pus	<i>E. clades</i>	+	-	-	-	-	+
101	Sang	Inclassable	-	+	+	-	-	+
106	Sang	B2	-	+	+	+	-	+
119	Sang	B2	-	+	-	-	-	+
123	Sang	Inclassable	+	-	-	-	-	+

Discussion

1. *E. coli* issues d'infections urinaires

Escherichia coli peut provoquer un large éventail de maladies humaines qui s'étendent du tractus gastro-intestinal aux sites extra-intestinaux. Ces dernières (ExPEC) désignent des souches d'*E. coli* capables de provoquer des infections telles que bactériémie, méningite, infections des voies urinaires, pneumonie et autres infections des tissus mous (Poolman et Wacker, 2016 ; Manges *et al.*, 2019). Leur pouvoir pathogène associé à une résistance accrue aux antibiotiques ont fait un véritable problème de santé publique (Tamadonfar *et al.*, 2019 ; Da-Silva *et al.*, 2020). De plus, l'émergence de nouveaux hybrides inquiète les personnels de santé qui se sentent de plus en plus démunis.

Elle est également considérée comme l'agent étiologique prédominant des infections urinaires (Bower *et al.*, 2005 ; Jahandeh *et al.*, 2015). Une bonne compréhension de la relation étroite entre les bactéries et la maladie peut aider à prévenir et à pallier à ce problème. De nombreuses études à travers le monde ont été conduites sur ce sujet. Nous avons cherché à nous pencher sur le sujet. Dans cette section, nous discutons et comparons nos résultats avec d'autres études similaires.

Dans notre étude, la fréquence des infections des voies urinaires chez les patientes était supérieure à celle des hommes (figure 18). Nos résultats sont en accord avec d'autres études précédemment rapportées dans ce domaine (Wang *et al.*, 2014 ; Dadi *et al.*, 2020), qui indiquent une incidence d'environ quatre fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes. Cette différence s'explique principalement par la longueur plus courte de l'urètre et une distance plus courte entre l'anus et l'ouverture urétrale chez la femme. Cependant, les infections urinaires sont plus graves chez les hommes, car souvent associées à une prostatite (Subashchandrabose *et al.*, 2015). De plus, il a été suggéré que le risque accru d'infection urinaire chez les femmes enceintes est dû notamment à des changements physiologiques (Ramos *et al.*, 2012 ; Johnson *et al.*, 2021).

Environ 50% des femmes ont eu au moins une infection urinaire au cours de leur vie (Aydin *et al.*, 2015). Près de 25% des personnes ayant eu une infection urinaire contracteront au moins une autre récurrence dans les 6 mois suivant l'infection initiale, même après un traitement avec des antibiotiques appropriés. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation plus importante des *E. coli* résistantes aux antibiotiques et par le réservoir intracellulaire quiescent (Lewis *et al.*, 2016). Les conditions d'hygiène et le niveau socio-économiques peuvent contribuer à l'amplification du nombre de cas.

Nos résultats ont montré que 22,7% des nourrissons de moins de 2 ans avaient une infection urinaire. Confirmant que les nouveau-nés et les nourrissons sont plus susceptibles d'être touchés. Cette vulnérabilité est due à un développement incomplet de leur système immunitaire (Chang *et al.*, 2006 ; Montini *et al.*, 2011).

Il a été rapporté que l'incidence des infections urinaires diminue à l'âge adulte, mais augmente chez les personnes âgées, ce qui est cohérent avec nos résultats (Figure 19). Plusieurs facteurs de risque contribuent au développement des infections urinaires chez les personnes âgées, cela est notamment lié aux modifications du système immunitaire et à un nombre croissant de comorbidités (Rowe *et al.*, 2013 ; Gonzales-Rodriguez *et al.*, 2020).

Nos résultats montrent une corrélation significative entre *E. coli* provenant de patients hospitalisés avec des infections urinaires et les gènes *pap* et *hlyA* ($p=0,041$ et $p=0,019$ respectivement) (tableau 14). Ces gènes pourraient être considérés comme biomarqueurs potentiels. La fréquence élevée des patients hospitalisés par rapport aux patients ambulatoires observée dans notre population est en accord avec des études menées en Tunisie (Tarchouna *et al.*, 2013) et en Allemagne (Toval *et al.*, 2014). L'un des facteurs de risque des infections urinaires est l'utilisation prolongée du cathéter et représente jusqu'à 80% des infections nosocomiales (Parker *et al.*, 2017), en grande partie en raison de la capacité des bactéries à établir un biofilm sur le cathéter qui résiste aux mécanismes de la défense de l'hôte et aux antibiotiques (Rowe *et al.*, 2013).

Les résultats du test de sensibilité aux antimicrobiens présentés dans cette étude (tableau 12) montrent que 72,2% des isolats étaient considérés comme MDR avec une résistance élevée à l'amoxicilline 85,6%, ce qui est comparable à une étude menée en Irak, 93,62% (Ibrahim *et al.*, 2020), suivie par la pipéracilline 83,5%, très similaire à l'étude menée en Chine, 76,8% (Wang *et al.*, 2014), mais supérieure à l'étude menée en Roumanie, 19,18% (Cristea *et al.*, 2019). Dans notre étude, le taux de résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique était de 69,1%, ce qui est inférieur aux études menées en Irak, 96,45% (Ibrahim *et al.*, 2020) et en Égypte, 86,7% (El-Mahdy *et al.*, 2021), mais supérieur aux études menées en Éthiopie, 29% (Dadi *et al.*, 2020), en Thaïlande, 36,5% (Tewawong *et al.*, 2020) et en Turquie, 27,8% (Düzgün *et al.*, 2019).

La faible fréquence de résistance à l'imipénem (2,1%) trouvée dans cette étude était presque similaire dans d'autres études menées en Chine, avec un taux de 1% (Wang *et al.*, 2014), Roumanie 0,12% (Cristea *et al.*, 2019), Irak 2,84% (Ibrahim *et al.*, 2020), Éthiopie 0% (Dadi *et al.*, 2020), Thaïlande 1,4% (Tewawong *et al.*, 2020) et Turquie 3,2% (Düzgün *et al.*, 2019). Cela confirme le fait que la résistance aux antibiotiques augmente dans les traitements des infections urinaires. Les variations des pourcentages selon les régions et les pays peuvent être liées à la spécificité de chacune à la consommation accrue ou pas d'antibiotiques.

Dans notre étude, le phylogroupe prédominant est B2 (45,36%) suivi de D (12,37%) (figure 21). L'analyse moléculaire des souches d'*E. coli* isolées des infections urinaires a révélé qu'elles sont phylogénétiquement distinctes des souches commensales ; ces souches appartiennent fréquemment en grande partie au phylogroupe B2 et en second lieu au phylogroupe D. Ces phylogroupes ont acquis de nombreux déterminants pathogéniques au fil du temps (Picard *et al.*, 1999). Ces résultats sont en accord avec des études menées en Pologne B2 : 38,1%, D : 35,3% (Kot *et al.*, 2016), Iran B2 : 55%, D : 21% (Rezatofighi *et al.*, 2021), Mongolie B2 : 33,8%, D : 28,4% (Munkhdelger *et al.*, 2017), Norvège B2 : 45%, D : 39% (Grude *et al.*, 2007), Danemark B2 : 67%, D : 13% (Ejrnæs *et al.*, 2011), Corée du Sud B2 : 79,31%, D : 15,51% (Lee *et al.*, 2016) et l'Éthiopie B2 : 30%, D : 27,5% (Dadi *et al.*, 2020). Dans d'autres études dans la littérature, le phylogroupe dominant était A (Grude *et al.*, 2007 ; Khairy *et al.*, 2019 ; El-Mahdy *et al.*, 2021) et dans d'autres le phylogroupe D (Robino *et al.*, 2014 ; Themphachanal *et al.*, 2015 ; Gao *et al.*, 2017 ; Sheikh *et al.*, 2019).

Un autre résultat intéressant trouvé en menant cette étude est la fréquence élevée du gène *astA* 47,42% avec 13 souches portant uniquement ce marqueur de virulence (tableau 15). En comparaison avec les études menées au Mexique qui ont trouvé, 33,5% (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017), l'Iran, 21,14% (Momtaz *et al.*, 2013) et l'Allemagne avec 8,7% (Toval *et al.*, 2014). Souvent associés à la diarrhée chez les enfants, les gènes *astA* sont généralement liés à *E. coli* entéroaggrégatif et semblent être l'un des gènes DEC les plus fréquemment exprimés dans l'UPEC. Par conséquent, ils ont le potentiel de provoquer des infections des voies urinaires et sont parfois associés à des gènes de marqueurs de virulence UPEC classiques (Boll *et al.*, 2013 ; Herzog *et al.*, 2013), confirmant les résultats obtenus dans notre étude montrant une fréquence élevée d'association des gènes *hlyA⁺astA⁺*, suivie par l'association *pap⁺astA⁺*.

Concernant les facteurs de virulence uropathogènes, nos résultats montrent que 41,24% des *E. coli* isolés portaient le gène *hlyA* ce qui est comparable aux études menées au Pakistan, 37% (Bashir *et al.*, 2012), en Norvège, 39% (Grude *et al.*, 2007), en Éthiopie, 51,5% (Dadi *et al.*, 2020) et Iran, 50,41% (Momtaz *et al.*, 2013). En fait, environ 40 à 50% des isolats d'*E. coli* provenant de patients atteints d'ITU codent pour la toxine α -hémolysine, ce qui conduit à la lyse cellulaire en formant des pores dans les cellules hôtes (Nagamatsu *et al.*, 2015). Cependant, de nombreuses autres études telles que celles menées en Mongolie, 8,1% (Munkhdelger *et al.*, 2017), Roumanie, 12,45% (Cristea *et al.*, 2019), Tunisie, 19% (Tarchouna *et al.*, 2013), Chine, 11,6% (Wang *et al.*, 2014), Iran, 15,6%, (Pourzare *et al.*, 2017), Turquie, 3,3% (Düzgün *et al.*, 2019), Égypte, 0,9% (Khairy *et al.*, 2019), Pologne, 18,5% (Kot *et al.*, 2016), Russie, 26% (Grude *et al.*, 2007), Roumanie, 18% (Usein *et al.*, 2001), Mexique, 15,4% (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017), Turquie, 1,3% (Yilmaz *et al.*, 2020) et Iran, 1,4% (Rezatofighi *et al.*, 2021) ont montré des taux plus faibles. Les pili associés à la pyélonéphrite sont notamment connus pour leur rôle permettant aux UPEC de se lier aux cellules hôtes. À ce stade, nos résultats sont en accord avec des études menées en Corée du Sud, 39,6% (Lee *et al.*, 2016), en Roumanie, 36% (Usein *et al.*, 2001), au Brésil, 32% (Santo *et al.*, 2006), en Éthiopie, 29,5% (Dadi *et al.*, 2020), en Pologne, 38,7% (Kot *et al.*, 2016) et Tunisie, 41% (Tarchouna *et al.*, 2013) ; mais inférieur à l'étude menée en Thaïlande, 79,3% (Tewawong *et al.*, 2020). De plus, nos résultats montrent une fréquence plus élevée d'association de gènes pap^+hlyA^+ et il y avait une association significative entre la présence des gènes *pap* et *hlyA* avec deux phylogroupes B1 ($p=0,049$, $p=0,021$ respectivement) et B2 ($p=0,002$, $p=0,001$ respectivement). Ce qui confirme que les deux gènes sont génétiquement liés et regroupés avec d'autres facteurs de virulence sur des régions de PAI, qui ont probablement été acquis par transfert horizontal de gènes (Oelschlaeger *et al.*, 2002 ; Desvaux *et al.*, 2020).

Les Afa, un groupe d'adhésines appartenant à la famille Dr, est exprimée à la fois par les pathogènes intestinaux DAEC et les souches UPEC. Des études épidémiologiques montrent que les isolats d'*E. coli* exprimant des adhésines Afa/Dr sont impliqués dans la cystite chez l'enfant avec 25 à 50% (Servin *et al.*, 2014). Fait intéressant, dans nos résultats, *afa* n'a été trouvé que dans une seule souche isolée d'enfants. De plus, le gène *afa* a été détecté dans 24,74% de nos isolats d'*E. coli* ce qui est en adéquation avec les études menées en Irak, 28,07% (Ibrahim *et al.*, 2020), Tunisie 20% (Tarchouna *et al.*, 2013), Roumanie 38,24% (Cristea *et al.*, 2019) et Turquie 16,6% (Düzgün *et al.*, 2019) ; mais supérieur aux

études menées en Pologne 4,6% (Kot *et al.*, 2016), en Thaïlande 7,7% (Tewawong *et al.*, 2020), en Corée du Sud 8,6% (Lee *et al.*, 2016) et en Iran 8,13% (Momtaz *et al.*, 2013).

Nous montrons à travers ce résultat que l'incidence des infections urinaires causées par les InPEC est assez faible. À notre connaissance, une seule étude menée par Yılmaz *et al.*, 2020 a obtenu des résultats presque similaires. L'absence de ces gènes pourrait être due à l'inactivation ou à la délétion de séquences génétiques lors de l'intégration de plasmides ou de génomes de phages dans un génome bactérien, ce qui peut conduire à une PCR négative.

Parmi les souches d'*E. coli* étudiées, 15,46% ne portent aucun des gènes de virulence prospectés. Ce qui ne signifie pas qu'elles sont commensales. En outre, elles peuvent être porteuses d'autres gènes non prospectés dans notre étude, et qui pourrait leur conférer le statut de pathogènes.

Les résultats de la relation entre les phylogroupes et les gènes de virulence ont révélé que 95,45% des souches du groupe B2 possèdent au moins un des gènes de virulence testés ($p=0,006$) et il y avait une association significative entre le phylogroupe B2 et trois gènes de virulence : *pap*, *hlyA* et *invE* ($p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,025$ respectivement) (tableau 16, 17) ; ce qui atteste de la forte virulence de ce groupe phylogénétique. Nos résultats montrent que plus de 9% des souches d'*E. coli* ont un phylogroupe inconnu en utilisant la nouvelle méthode quadruplex de phylogroupage de Clermont *et al.*, 2013. Toutes codent pour au moins un marqueur de virulence étudié. De plus, il y avait une association significative entre ces souches et le gène *astA* ($p=0,008$). Contrairement à nos résultats, Clermont *et al.*, 2013 ont constaté que seulement 1% des souches d'*E. coli* étudiées par cette méthode n'appartenaient pas à l'un des groupes phylogénétiques. En accord avec cela, une étude menée par Tewawong *et al.*, 2020 a montré que 1,4% de souches d'*E. coli* étaient inclassable. En revanche, deux autres études menées en Iran ; par Iranpour *et al.*, 2015 et Boroumand *et al.*, 2021 ont démontré que 27,1% et 20,2%, respectivement, des *E. coli* isolés chez des patients atteints d'infection urinaire restaient non classés. Cela indique que d'autres phylogroupes pourraient être découverts à l'avenir et que le ratio de souches inconnues diffère en fonction de leur répartition géographique et des caractéristiques de la population. En effet une nouvelle étude conduite par Clermont *et al.*, 2019 a permis l'identification d'un nouveau phylogroupe nommé « G ».

Nous avons également prospecté dans cette étude de nouvelles souches hybrides. Nous avons identifié quatre hybrides ExPEC/InPEC. En utilisant des gènes typiques codant pour la virulence comme marqueurs diagnostiques des différents pathotypes InPEC (tableau 18). Seul le gène *invE* a été détecté, ce qui confirme l'importance de ce phénomène récent. Ce qui est similaire à une étude récente menée en 2022 par Nascimento *et al.*, des souches issues de patients atteints d'infections urinaires ont révélé la présence de 3 hybrides, deux souches portant les gènes *eae* et *escA* et l'autre le gène *aggR* (Nascimento *et al.*, 2022). De plus, Lara *et al.*, 2017 ont identifié 3 souches hybrides, deux d'infections urinaires et une souche de bactériémie. De même, Kessler *et al.*, 2015 ont découvert un isolat hybride provenant d'un patient souffrant de diarrhée et de bactériémie et conduisant à un dysfonctionnement multiviscéral. Les souches hybrides ExPEC/InPEC sont plus virulentes, car elles ont la capacité de coloniser différents sites et ont ainsi le pouvoir de provoquer des infections intra et extra-intestinales (Gomes *et al.*, 2016). Malgré cette capacité, ces souches restent peu fréquentes et ne provoquent pas directement de diarrhée (Santos *et al.*, 2020).

2. Comparaison avec diverses infections ExPEC

Dans notre étude, l'écart entre le sexe féminin et masculin des prélèvements issus de différentes infections est moins élevé comparé aux infections urinaires (figure 25), de même pour l'âge des patients (figure 24), ce qui est en adéquation avec les études menées en Inde (Hiremath *et al.*, 2020). Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par le fait que l'être humain est sujet à différentes infections au cours de sa vie quel que soit le sexe ou l'âge par contre les recherches ont démontré la corrélation entre les ITUs et le sexe et l'âge des patients (Alperin *et al.*, 2019 ; Sakamoto *et al.*, 2019) .

Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des *E. coli* issus de différentes infections (tableau 19) ont révélé des taux de résistance et de sensibilité quasi identiques à ce des ITUs. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré des résistances importantes des souches d'*E. coli* à la majorité des antibiotiques testés. Ces résistances seraient due à leur utilisation anarchique et abusive, conséquence de prescriptions le plus souvent empiriques du personnel médical (Prère *et al.*, 2004).

Le phylogroupe prédominant pour les prélèvements est B2 (figure 27). Ces résultats sont en accord avec d'autres études (Micenková *et al.*, 2016 ; El-Baz *et al.*, 2022), ainsi qu'avec les prélèvements issus d'ITUs. La prévalence du phylogroupe B2 de nos souches peut s'expliquer du fait que tous les prélèvements sont d'origine extra-intestinale.

En effet, selon la littérature, le phylogroupe B2 est souvent lié aux ExPEC et représente la plus large diversité parmi tous les phylogroupes d'*E. coli*, suggérant qu'il ait le statut de sous-espèce, comprenant des sous-groupes corrélés avec un pool génétique flexible ayant diverses combinaisons de FVs (Tourret *et al.*, 2016 ; Clermont *et al.*, 2019 ; Desvaux *et al.*, 2020).

Le deuxième phylogroupe détecté était B1. Ce phylogroupe est généralement associé à des souches commensales d'*E. coli*. Cependant, des études récentes ont démontré que de plus en plus de souches ExPEC appartiennent au phylogroupe B1 (Lara *et al.*, 2017 ; Olesen *et al.*, 2012 ; Nascimento *et al.*, 2022).

Nos résultats ont montré que le gène de virulence *pap* a été détecté avec la fréquence la plus élevée (figure 28). Souvent associé aux infections urinaires, il est généralement retrouvé avec des fréquences beaucoup plus basses dans les autres prélèvements biologiques (Le Bouguenec *et al.*, 1992 ; Pass *et al.*, 2000). Autre résultat intéressant, la présence du gène *eaeA* dans 5 prélèvements issus de différentes infections ExPEC, ainsi qu'une association significative avec les patients ambulatoires.

Similaires aux résultats obtenus pour les ITUs, les gènes de virulence *pap* et *hlyA* montrent une association significative avec le phylogroupe B2 (tableau 24). Confirmant la relation des 2 gènes entre eux et celle avec le phylogroupe B2 mentionnée précédemment. De plus, les résultats obtenus dans les 2 souchiers ont révélés une corrélation significative entre le gène *astA* et les souches ayant un phylogroupe inconnu, ce qui conforte l'hypothèse qu'il y est d'autres phylogroupes à découvrir plus ou moins virulents.

La prospection des hybrides révèle la présence de 10 souches dans les prélèvements de différentes infections extra-intestinales portant les deux gènes *invE* et *eaeA* (tableau 25), contrairement aux hybrides issus d'ITUs avec la seule présence du gène *invE*. Cinq d'entre eux sont inclassables phylogénétiquement, confirmant la virulence de ces souches.

Dans notre étude, les résultats obtenus nous laissent perplexes sur le taux d'hybrides qui semble élevé compte tenu du nombre limité de gènes prospectés.

*Conclusion
et
Perspectives*

La variété des souches d'*E. coli* est étonnante, englobant les commensaux naturels du tractus gastro-intestinal ainsi que les pathogènes intestinaux et extra-intestinaux pouvant entraîner diverses maladies et manifestations cliniques.

Nos résultats ont montré que les gènes *astA*, *hlyA* et *pap* étaient les marqueurs de virulence les plus prédominants parmi les *E. coli* isolés de patients atteints d'infections urinaires, ainsi que pour les isolats issus de différentes infections extra-intestinales. Les résultats obtenus ont révélé une absence totale des gènes *stx1*, *stx2* et *ST1* sur toutes les souches étudiées. Le groupe phylogénétique le plus prédominant était B2 avec une prévalence élevée des déterminants de la virulence correspondants. Notre étude a également montré un taux plus élevé de souches phylogénétiquement inclassables qu'habituellement mentionné dans d'autres rapports.

L'analyse statistique des résultats obtenus a révélé plusieurs associations significatives entre des gènes de virulence avec des groupes phylogénétiques, de même qu'avec des patients hospitalisés présentant des ITUs, ainsi, qu'entre des gènes de virulence et le type de prélèvement biologique dans le cas des souches issues de différentes infections.

Nos résultats apportent des éléments de preuves concernant l'émergence et la propagation de nouvelles souches hybrides susceptibles d'être à l'origine à la fois d'infections intestinales et extra-intestinales. Les données obtenues dans cette étude illustrent un taux beaucoup plus élevé de ces souches en comparaison avec d'autres études réalisées à travers le monde. Le nombre de ces souches hybrides était plus élevé au sein des prélèvements de diverses infections en comparaison aux souches issues d'infections urinaires.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude sur ce sujet qui a été réalisée en Algérie. L'étude de nouveaux marqueurs de virulence pour les souches d'*E. coli* apparaît comme la suite logique des recherches à entreprendre. Cela dans le but de dresser un profil génétique complet regroupant un nombre important de facteurs de virulence. Aussi, une meilleure détermination phylogénétique des souches d'*E. coli*, qui en somme semble ne pas avoir encore révélé tous ses mystères en raison de la découverte de nouveaux phylogroupes, semble pertinente. *Escherichia coli*, commensal et pathogène à la fois, fait aujourd'hui office d'un spécimen d'étude très intéressant de par sa fréquence et son imputation dans la survenue d'infections intra et extra-intestinales très variées.

Il est important d'orienter et d'élargir cette prospection à diverses régions du pays, couvrant des patients de différents âges et différentes situations socio-économiques. Cela permettra de fournir une meilleure compréhension de la prévalence et de la distribution géographique du modèle de gène de virulence des ExPEC et de leurs groupes phylogénétiques, ainsi que de leur association.

Une meilleure caractérisation des souches UPEC et ExPEC, ainsi que l'identification et le dépistage des facteurs de virulence permettront d'améliorer le diagnostic des souches ExPEC et apporteront des solutions thérapeutiques alternatives et ciblées contre différentes infections extra-intestinales pour pallier à la croissance accrue de la résistance aux antibiotiques renforcée par l'antibiothérapie systémique qui est à ce jour le seul moyen pour venir à bout de ces infections. Parmi ces solutions en cours d'études, la mise au point d'un vaccin préventif. Pour ce faire, la collecte des divers résultats des études réalisées de par le monde sur cette thématique de recherche semble cruciale afin d'élaborer un panel de facteurs de virulence assez représentatif et universel.

L'émergence de souches hybrides, conséquence de la plasticité du génome de cette bactérie, entraîne une modification constante de son matériel génétique. À notre humble avis, il nous semble urgent à l'heure actuelle d'orienter les efforts de recherches sur ce phénomène qui ne cesse de s'accroître. En parallèle, il nous semble également important de revoir et d'améliorer le concept de marqueurs de virulence spécifiques à un pathotype. Dans ce contexte, il nous paraît inévitable que de nouveaux hybrides, de plus en plus virulents et agressifs, émergeront dans un futur pas si lointain... à nous de s'y préparer.

*Références
bibliographiques*

1. AFSSA, Les Escherichia coli producteur de shiga toxine, Avril 2003.
2. Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of medical research*, 36(6), 697-705.
3. Alperin, M., Burnett, L., Lukacz, E., & Brubaker, L. (2019). The mysteries of menopause and urogynecologic health: clinical and scientific gaps. *Menopause (New York, NY)*, 26(1), 103.
4. Aranda, K. R. S., Fagundes-Neto, U., & Scaletsky, I. C. A. (2004). Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5849-5853.
5. Aydin, A., Ahmed, K., Zaman, I., Khan, M. S., & Dasgupta, P. (2015). Recurrent urinary tract infections in women. *International urogynecology journal*, 26(6), 795-804.
6. Babic, A., Lindner, A. B., Vulic, M., Stewart, E. J., & Radman, M. (2008). Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science*, 319(5869), 1533-1536.
7. Balière, C. (2016). *Les Escherichia coli potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral: cas des STEC et des EPEC* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale).
8. Barraud, O., & Ploy, M. C. (2011). Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques: mise au point. *Journal des Anti-infectieux*, 13(3), 133-144.
9. Bashir, S., Haque, A., Sarwar, Y., Ali, A., & Anwar, M. I. (2012). Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic E. coli from Faisalabad region of Pakistan. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 1-6.
10. Becattini, S., Taur, Y., & Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends in molecular medicine*, 22(6), 458-478.
11. Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S347-S357.
12. Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., & Petit, F. (2013). Evidence for coexistence of distinct Escherichia coli populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Applied and environmental microbiology*, 79(15), 4684-4693.
13. Blount, Z. D. (2015). The natural history of model organisms: The unexhausted potential of E. coli. *Elife*, 4, e05826.

14. Boll, E. J., Struve, C., Boisen, N., Olesen, B., Stahlhut, S. G., & Krogfelt, K. A. (2013). Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infection and immunity*, *81*(4), 1164-1171.
15. Bonnet, J. (2014). Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin. *Démarche d'accompagnement dans sept élevages* (Doctoral dissertation).
16. Boroumand, M., Naghmachi, M., & Ghatee, M. A. (2021). Detection of phylogenetic groups and drug resistance genes of *Escherichia coli* causing urinary tract infection in Southwest Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *14*(2).
17. Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1683), 819-827.
18. Bourgeois, A. L., Wierzbza, T. F., & Walker, R. I. (2016). Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, *34*(26), 2880-2886.
19. Bower, J. M., Eto, D. S., & Mulvey, M. A. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, *6*(1), 18-31.
20. Branchu, P. (2012). *Pathogénicité des Escherichia coli entérohémorragiques: identification de voies de régulation contrôlant la mobilité, la formation de biofilm et le locus d'effacement des entérocytes* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2)).
21. Braz, V. S., Melchior, K., & Moreira, C. G. (2020). *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 548492.
22. CA-SFM. (2016). Société Française de Microbiologie. URL: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM2016_V1.0_FEVRIER.pdf.
23. Chang, S. L., & Shortliffe, L. D. (2006). Pediatric urinary tract infections. *Pediatric Clinics*, *53*(3), 379-400.
24. Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(2), 214-226.
25. Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, *66*(10), 4555-4558.
26. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*, *5*(1), 58-65.

27. Clermont, O., Gordon, D., & Denamur, E. (2015). Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology*, *161*(5), 980-988.
28. Conway, T., & Cohen, P. S. (2015). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Metabolism and bacterial pathogenesis*, 343-362.
29. Cristea, V. C., Gheorghe, I., Czobor Barbu, I., Popa, L. I., Ispas, B., Grigore, G. A., ... & Popa, I. M. (2019). Snapshot of phylogenetic groups, virulence, and resistance markers in *Escherichia coli* uropathogenic strains isolated from outpatients with urinary tract infections in Bucharest, Romania. *BioMed research international*, 2019.
30. Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(1), 26-38.
31. Dadi, B. R., Abebe, T., Zhang, L., Mihret, A., Abebe, W., & Amogne, W. (2020). Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC infectious diseases*, *20*(1), 1-12.
32. Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, *71*(6), 615-626.
33. Daubin, V., & Szöllösi, G. J. (2016). Horizontal gene transfer and the history of life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(4), a018036.
34. Delarras, C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Lavoisier. 772 pages.
35. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(1), 37-54.
36. Denis F., Ploy MC., Martin C., Bingen É. et Quentin R. (2007). *Bactériologie médicale Techniques usuelles*. Elsevier Masson. 631 pages.
37. Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2020). Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2065.
38. Diallo, A. A. (2013). *Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III).
39. Dobrindt, U. (2005). (Patho-) genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, *295*(6-7), 357-371.

40. Dosso, M., Bissagnene, E., Coulibaly, M., Paye, H. K., N'Douba, A., Guessennnd, N., ... & Kadio, A. (2000). Résistances acquises et prescriptions d'antibiotiques en Afrique: quelles adéquations?. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 30, s197-s204.
41. Düzgün, A. Ö., Okumuş, F., Saral, A., Çiçek, A. Ç., & Cinemre, S. (2019). Determination of antibiotic resistance genes and virulence factors in Escherichia coli isolated from Turkish patients with urinary tract infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52.
42. Ejrnæs, K., Stegger, M., Reisner, A., Ferry, S., Monsen, T., Holm, S. E., ... & Frimodt-Møller, N. (2011). Characteristics of Escherichia coli causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*, 2(6), 528-537.
43. El abdani, S. (2016). *Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques et conseils en antibiothérapie* (Doctoral dissertation).
44. El-Baz, R., Said, H. S., Abdelmegeed, E. S., & Barwa, R. (2022). Characterization of virulence determinants and phylogenetic background of multiple and extensively drug resistant Escherichia coli isolated from different clinical sources in Egypt. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(3), 1279-1298.
45. El-Mahdy, R., Mahmoud, R., & Shrief, R. (2021). Characterization of E. coli phylogroups causing catheter-associated urinary tract infection. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3183.
46. Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in Escherichia coli. *Molecular biology and evolution*, 21(6), 1085-1094.
47. Estrada-Garcia, T., Perez-Martinez, I., Bernal-Reynaga, R., & Zaidi, M. B. (2014). Enteroggregative Escherichia coli: a pathogen bridging the north and south. *Current tropical medicine reports*, 1(2), 88-96.
48. Euzéby, J. P. (2004). Dictionnaire De Bactériologie Veterinaire. Morphologie et structure des bactéries (procaryotes). URL: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/photobacterium/html>.
49. Euzéby, J. P. (2005). Entérobacteriaceae « Entérobactériales ». Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, 2005. URL: <http://www.anne.decoستر.free.fr/bgn/enter.html>.

50. Farajzadah Sheikh, A., Goodarzi, H., Yadyad, M. J., Aslani, S., Amin, M., Jomehzadeh, N., ... & Hashemzadeh, M. (2019). Virulence-associated genes and drug susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Infection and drug resistance*, 2039-2047.
51. Fleckenstein, J. M., & Kuhlmann, F. M. (2019). Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Current infectious disease reports*, 21(3), 1-9.
52. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, 13(5), 269-284.
53. Gao, Q., Zhang, D., Ye, Z., Zhu, X., Yang, W., Dong, L., ... & Liu, X. (2017). Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes. *Microbial pathogenesis*, 104, 217-224.
54. Gazengel, J. M., Orecchioni, A.M. (2013) *Le préparateur en pharmacie. 2^{ème} édition*. Lavoisier. 1761 pages.
55. Gogarten, J. P., & Townsend, J. P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 679-687.
56. Goldenfeld, N., & Woese, C. (2007). Biology's next revolution. *Nature*, 445(7126), 369-369.
57. Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., ... & Martinez, M. B. (2016). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *brazilian journal of microbiology*, 47, 3-30.
58. Gonzales-Rodriguez, A. O., Infante Varillas, S. F., Barrón Pastor, H. J., Llimpe Mitma, Y., Huerta Canales, D., Wong Chero, P. A., ... & Suarez Cunza, S. (2020). Immunological and biochemical response of older adults with urinary tract infection to uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37, 527-531.
59. Grude, N., Potaturkina-Nesterova, N. I., Jenkins, A., Strand, L., Nowrouzian, F. L., Nyhus, J., & Kristiansen, B. E. (2007). A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. *Clinical microbiology and infection*, 13(2), 208-211.

60. Guignot, J., Breard, J., Bernet-Camard, M. F., Peiffer, I., Nowicki, B. J., Servin, A. L., & Blanc-Potard, A. B. (2000). Pyelonephritogenic diffusely adhering *Escherichia coli* EC7372 harboring Dr-II adhesin carries classical uropathogenic virulence genes and promotes cell lysis and apoptosis in polarized epithelial Caco-2/TC7 cells. *Infection and immunity*, 68(12), 7018-7027.
61. Harrington, S. M., Dudley, E. G., & Nataro, J. P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters*, 254(1), 12-18.
62. Herzog, K., Engeler Dusel, J., Hugentobler, M., Beutin, L., Sägesser, G., Stephan, R., ... & Nüesch-Inderbinnen, M. (2014). Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infection*, 42(2), 441-444.
63. Hiremath, M. B., & Lava, R. Study of virulence factors and antibiotic susceptibility pattern of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Blood*, 12, 8-0.
64. Horiike, T. (2016). An introduction to molecular phylogenetic analysis. *Reviews in Agricultural Science*, 4, 36-45.
65. Horton, H. R., Moran, L. A., Raymond S., Ochs, Rawn, J. D., & Scrimgeour, K. G. (1994). *Principes de biochimie*. De Boeck université.
66. Ibrahim, M. S., Khalid, H. M., & Mero, W. M. (2020). Molecular Characterization of Some Virulence Genes and Antibiotic Susceptibility Pattern among Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Patient in Zakho City/Iraq. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 32(2), 167-177.
67. Iranpour, D., Hassanpour, M., Ansari, H., Tajbakhsh, S., Khamisipour, G., & Najafi, A. (2015). Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *BioMed Research International*, 2015.
68. Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and environments*, 23(2), 101-108.
69. Ito, F., Ogino, T., Ito, K., & Watanabe, H. (1992). Differentiation and detection of pathogenic determinants among diarrheagenic *Escherichia coli* by PCR using mixed primers. *Nippon Rinshou*, 50, 343-347.
70. Jahandeh, N., Ranjbar, R., Behzadi, P., & Behzadi, E. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Central European journal of urology*, 68(4), 452.

71. Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 570-581.
72. Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., ... & Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC genomics*, 9(1), 1-14.
73. Johnson, B., Stephen, B. M., Joseph, N., Asiphas, O., Musa, K., & Taseera, K. (2021). Prevalence and bacteriology of culture-positive urinary tract infection among pregnant women with suspected urinary tract infection at Mbarara regional referral hospital, South-Western Uganda. *BMC pregnancy and childbirth*, 21(1), 1-9.
74. Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., & Ploy, M. C. (2010). Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS genetics*, 6(1), e1000793.
75. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140.
76. Kessler, R., Nisa, S., Hazen, T. H., Horneman, A., Amoroso, A., Rasko, D. A., & Sonnenberg, M. S. (2015). Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes. *Pathogens and disease*, 73(8).
77. Khairy, R. M., Mohamed, E. S., Abdel Ghany, H. M., & Abdelrahim, S. S. (2019). Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrheagenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One*, 14(9), e0222441.
78. Kim, K. S. (2016). Human meningitis-associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1).
79. Kot, B., Wicha, J., Gruzewska, A., Piechota, M., Wolska, K., & Obrebska, M. (2016). Virulence factors, biofilm-forming ability, and antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. *Turkish journal of medical sciences*, 46(6), 1908-1914.
80. Lara, F. B., Nery, D. R., De Oliveira, P. M., Araujo, M. L., Carvalho, F. R., Messias-Silva, L. C., ... & Pereira, A. L. (2017). Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. *Frontiers in microbiology*, 8, 146.

81. Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(5), 1189-1193.
82. Lecointre, G., & Le Guyader, H. (2017). *Classification phylogénétique du vivant: tome 2* (p. 1). Belin.
83. Lee, J. H., Subhadra, B., Son, Y. J., Kim, D. H., Park, H. S., Kim, J. M., ... & Choi, C. H. (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letters in applied microbiology*, 62(1), 84-90.
84. Lewis, A. J., Richards, A. C., & Mulvey, M. A. (2017). Invasion of host cells and tissues by uropathogenic bacteria. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 359-381.
85. Lezzar, N. *Etudes comparatives des souches d'Escherichia coli aviaires et humaines* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri Constantine1).
86. Loubet, P., Ranfaing, J., Dinh, A., Dunyach-Remy, C., Bernard, L., Bruyère, F., ... & Sotto, A. (2020). Alternative therapeutic options to antibiotics for the treatment of urinary tract infections. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1509.
87. Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Advances in microbial physiology*, 65, 337-372.
88. Machado, J., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1998). Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns. *Research in microbiology*, 149(2), 119-135.
89. Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), 2-12.
90. Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00135-18.
91. Marabito, S. (2014). *Pathogenic Escherichia coli*. 314 pages.
92. Maris, S. (2016). *Caractérisation de souches d'Escherichia coli pathogènes urinaires provenant de Guadeloupe: portrait de la diversité des facteurs de virulences présents* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).

93. Martiny, J. B., Jones, S. E., Lennon, J. T., & Martiny, A. C. (2015). Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science*, 350(6261), aac9323.
94. Massot, M., Picard, B., & Denamur, E. (2016). Diversité des populations d'Escherichia coli et leurs variations au cours du temps au sein du microbiote intestinal. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2016(486), 35-43.
95. Messika, J. (2017). *Escherichia coli, de la colonisation oropharyngée à l'infection pulmonaire: épidémiologie et physiopathologie* (Doctoral dissertation, Université Sorbonne Paris Cité).
96. Micenková, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A., & Šmajš, D. (2016). Human extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. *BMC microbiology*, 16(1), 1-8.
97. Miquel, S. (2010). *Facteurs de virulence de Escherichia coli adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn: caractérisation et régulation de leur expression* (Doctoral dissertation, Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I; Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
98. Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., De Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., ... & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82. *PloS one*, 5(9), e12714.
99. Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safarpour Dehkordi, F., Ranjbar, R., Sarshar, M., & Souod, N. (2013). Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12(1), 1-12.
100. Montini, G., Tullus, K., & Hewitt, I. (2011). Febrile urinary tract infections in children. *New England Journal of Medicine*, 365(3), 239-250.
101. Munkhdelger, Y., Gunregjav, N., Dorjpurev, A., Juniichiro, N., & Sarantuya, J. (2017). Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic Escherichia coli in Mongolia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(01), 51-57.
102. Muylaert, A., & Mainil, J. (2013). Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur "contagiosité". In *Annales de Médecine vétérinaire* (Vol. 156). ULg-Université de Liège, Liège, Belgium.

103. Nagamatsu, K., Hannan, T. J., Guest, R. L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Binkley, J., ... & Hultgren, S. J. (2015). Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), E871-E880.
104. Nascimento, J. A., Santos, F. F., Santos-Neto, J. F., Trovão, L. O., Valiatti, T. B., Pinaffi, I. C., ... & Gomes, T. A. (2022). Molecular Epidemiology and Presence of Hybrid Pathogenic *Escherichia coli* among Isolates from Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Microorganisms*, 10(2), 302.
105. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
106. Nielsen, K. L., Stegger, M., Godfrey, P. A., Feldgarden, M., Andersen, P. S., & Frimodt-Møller, N. (2016). Adaptation of *Escherichia coli* traversing from the faecal environment to the urinary tract. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(8), 595-603.
107. Ochman, H., & Selander, R. K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of bacteriology*, 157(2), 690-693.
108. Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., & Hacker, J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International journal of antimicrobial agents*, 19(6), 517-521.
109. Olesen, B., Scheutz, F., Andersen, R. L., Menard, M., Boisen, N., Johnston, B., ... & Johnson, J. R. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* O78: H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3703-3711.
110. OMS. (2014). *Antimicrobial resistance global Report on Surveillance*. (Organisation Mondiale de la Santé, Ed.). Genève (Suisse). 256p.
111. OMS. (2020). Organisation mondiale de la santé. URL: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
112. OMS. (2022). Organisation mondiale de la santé. URL: <https://www.who.int/fr/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>.
113. Oren, A (2010). Papke, RT (ed.). *Molecular Phylogeny of Microorganisms*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-67-7.

114. Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R., Domínguez-Trejo, P., Vaca-Paniagua, F., & Vaca, S. (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), 478-485.
115. Parker, V., Giles, M., Graham, L., Suthers, B., Watts, W., O'Brien, T., & Searles, A. (2017). Avoiding inappropriate urinary catheter use and catheter-associated urinary tract infection (CAUTI): a pre-post control intervention study. *BMC health services research*, 17(1), 1-9.
116. Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M. L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., ... & Prosseda, G. (2017). The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. *Frontiers in microbiology*, 8, 2390.
117. Perna, A., Hay, E., Contieri, M., De Luca, A., Guerra, G., & Lucariello, A. (2020). Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC): cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD?. *Journal of cellular physiology*, 235(6), 5041-5049.
118. Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., ... & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and immunity*, 67(2), 546-553.
119. Poolman, J. T., & Wacker, M. (2016). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field. *The Journal of infectious diseases*, 213(1), 6-13.
120. Pourzare, M., Derakhshan, S., & Roshani, D. (2017). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Sanandaj, Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 5(3).
121. Prère M.-F., Licznar P., Decramer S., Fayet O. (2004). *Escherichia coli* des infections urinaires et pyélonéphrites aiguës en pédiatrie : 1% des souches sont résistantes à certaines céphalosporines de 3e génération. *Pathol Biol*, 52 : 497– 500.
122. Ramos, N. L., Sekikubo, M., Dzung, D. T. N., Kosnopfel, C., Kironde, F., Mirembe, F., & Brauner, A. (2012). Uropathogenic *Escherichia coli* isolates from pregnant women in different countries. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3569-3574.
123. Rezatofighi, S. E., Mirzarazi, M., & Salehi, M. (2021). Virulence genes and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from patients with

- urinary tract infection and uninfected control subjects: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1-11.
124. Richard, D., Nattier, R., Richard, G., & Soubaya, T. (2014). *Atlas de phylogénie: La classification du vivant en fiches et en images*. Dunod.
125. Robino, L., García-Fulgueiras, V., Araujo, L., Algorta, G., Pérez, M. C., & Vignoli, R. (2014). Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 293-298.
126. Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., Leon-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millan, A. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 347-359.
127. Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., & Rosini, R. (2018). Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: insights for vaccine development. *Frontiers in microbiology*, 9, 440.
128. Rowe, T. A., & Juthani-Mehta, M. (2013). Urinary tract infection in older adults. *Aging health*, 9(5), 519-528.
129. Roy, S. S., Dasgupta, R., & Bagchi, A. (2014). A review on phylogenetic analysis: a journey through modern era. *Computational Molecular Bioscience*, 4(03), 39.
130. Sabri, M. (2008). *Étude sur l'importance relative des transporteurs des cations divalents du zinc, fer et manganèse dans la virulence des souches extra-intestinales pathogènes d'Escherichia coli (ExPEC)* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
131. Sakamoto, S., Miyazawa, K., Yasui, T., Iguchi, T., Fujita, M., Nishimatsu, H., ... & Ichikawa, T. (2019). Chronological changes in epidemiological characteristics of lower urinary tract urolithiasis in Japan. *International Journal of Urology*, 26(1), 96-101.
132. Santo, E., Macedo, C., & Marin, J. M. (2006). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48, 185-188.
133. Santos, A. C. D. M., Santos, F. F., Silva, R. M., & Gomes, T. A. T. (2020). Diversity of hybrid-and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 339.
134. Sensen, C. W. (2008). *Essentials of genomics and bioinformatics*. John Wiley & Sons. 442 pages.

135. Servin, A. L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 264-292.
136. Servin, A. L. (2014). Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 823-869.
137. Shah, C., Baral, R., Bartaula, B., & Shrestha, L. B. (2019). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC microbiology*, 19(1), 1-6.
138. Shawki, A., & McCole, D. F. (2017). Mechanisms of intestinal epithelial barrier dysfunction by adherent-invasive *Escherichia coli*. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 3(1), 41-50.
139. Shulman, S. T., Friedmann, H. C., & Sims, R. H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. *Clinical infectious diseases*, 45(8), 1025-1029.
140. Smati, M. (2014). *Place de la structure génétique de l'espèce Escherichia coli dans l'état de son commensalisme intestinal et dans l'expression de sa virulence* (Doctoral dissertation, Université Paris-Nord-Paris XIII).
141. Sobral, D. (2012). *De l'usage du polymorphisme de répétitions en tandem pour l'étude des populations bactériennes: mise au point et validation d'un système de génotypage automatisé utilisant la technique de MLVA* (Doctoral dissertation, Paris 11).
142. Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. (2017). Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 235-261.
143. Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W., & Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6), e450-e453.
144. Tassy, P. (1992). L'analyse phylogénétique et l'analyse de parcimonie: S'agit-il de la même chose?. *Geobios*, 25, 225-231.
145. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 8(3), 207-217.
146. Tewawong, N., Kowaboot, S., Pimainog, Y., Watanagul, N., Thongmee, T., & Poovorawan, Y. (2020). Distribution of phylogenetic groups, adhesin genes, biofilm formation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand. *PeerJ*, 8, e10453.

147. Themphachana, M., Kongpheng, S., Rattanachuy, P., Khianggam, S., Singkhamanan, K., & Sukhumungoon, P. (2015). Molecular characterization of virulence and antimicrobial susceptibility profiles of uropathogenic *Escherichia coli* from patients in a tertiary hospital, southern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 46(6), 1021.
148. Tibo, L. H. S., Bertol, J. W., Bernedo-Navarro, R. A., & Yano, T. (2016). Cytotoxic factor (SPF) secreted by *Escherichia coli* associated with sepsis (SEPEC) facilitates transcytosis through human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) monolayers.
149. Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., ... & Kokešová, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology letters*, 93(2-3), 97-108.
150. Touchon, M., Perrin, A., De Sousa, J. A. M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C. L., ... & Rocha, E. P. (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS genetics*, 16(6), e1008866.
151. Turret, J., & Denamur, E. (2017). Population phylogenomics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 207-233.
152. Touzeau, B. (2009). *Les colibacillooses néonatonatales caprines: évaluation du rôle pathogène d'Escherichia coli* (Doctoral dissertation).
153. Toval, F., Köhler, C. D., Vogel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Fruth, A., ... & Dobrindt, U. (2014). Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *Journal of clinical microbiology*, 52(2), 407-418.
154. Trifillis, A. L., Donnenberg, M. S., Cui, X., Russell, R. G., Utsalo, S. J., Mobley, H. L., & Warren, J. W. (1994). Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. *Kidney international*, 46(4), 1083-1091.
155. Ulett, G. C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A. J., Sweet, M. J., & Schembri, M. A. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current opinion in microbiology*, 16(1), 100-107.
156. Um, M. M. (2016). *Escherichia coli entérohéorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques: contamination des effluents d'origine bovine* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).

157. Usein, C. R., Damian, M., Tatu-Chitoiu, D., Capusa, C., Fagaras, R., Tudorache, D., ... & Le Bouguéneq, C. (2001). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *Journal of cellular and molecular medicine*, 5(3), 303-310.
158. Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5(2), 173-183.
159. Venturini, C., Hassan, K. A., Roy Chowdhury, P., Paulsen, I. T., Walker, M. J., & Djordjevic, S. P. (2013). Sequences of two related multiple antibiotic resistance virulence plasmids sharing a unique IS 26-related molecular signature isolated from different *Escherichia coli* pathotypes from different hosts. *PLoS One*, 8(11), e78862.
160. Vila, J., Gene, A., Vargas, M., Gascon, J., Latorre, C., & De Anta, M. J. (1998). A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1). *Journal of medical microbiology*, 47(10), 889-891.
161. Vounba, P. (2019). *Pathogénicité potentielle et résistance antimicrobienne des Escherichia coli isolés des poulets au Sénégal, au Canada (Québec) et au Vietnam*. (Doctoral dissertation).
162. Wang, Y., Zhao, S., Han, L., Guo, X., Chen, M., Ni, Y., ... & He, P. (2014). Drug resistance and virulence of uropathogenic *Escherichia coli* from Shanghai, China. *The Journal of antibiotics*, 67(12), 799-805.
163. Weiss, K. (2002). La résistance bactérienne. *Congrès de formation médicale continue FMOQ Le Médecin du Québec*, 37(3).
164. Wijetunge, D. S. S., Gongati, S., DebRoy, C., Kim, K. S., Couraud, P. O., Romero, I. A., ... & Kariyawasam, S. (2015). Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). *BMC microbiology*, 15(1), 1-15.
165. Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology*, 85(1), 11-19.
166. Winfield, M. D., & Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 3687-3694.
167. Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221-271.

168. Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
169. Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature reviews genetics*, 13(5), 303-314.
170. Yılmaz, E. Ş., & Aslantaş, Ö. (2020). Phylogenetic group/subgroups distributions, virulence factors, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains from urinary tract infections in Hatay. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53.
171. Young, A. D., & Gillung, J. P. (2020). Phylogenomics—principles, opportunities and pitfalls of big-data phylogenetics. *Systematic Entomology*, 45(2), 225-247.
172. Zhaxybayeva, O., & Gogarten, J. P. (2004). Cladogenesis, coalescence and the evolution of the three domains of life. *TRENDS in Genetics*, 20(4), 182-187.

Annexes

Annexe 01. Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des cmi et des diamètres des zones d'inhibition des Enterobacteriaceae (CA-SFM, 2016).

- Méthode par diffusion en milieu gélosé
- Milieu de culture : gélose Mueller-Hinton
- Inoculum : 0,5 McFarland
- Incubation : atmosphère normale, 35±2°C, 20±4H
- Contrôle de qualité : *Escherichia coli* ATCC 25922

Pénicillines	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<p>Les Enterobacteriaceae productrices de BLSE sont souvent catégorisées «sensibles» aux pénicillines associées aux inhibiteurs de β-lactamases de classe A (acide clavulanique, tazobactam). Si l'utilisation d'une de ces associations est retenue par le clinicien pour traiter une infection due à une entérobactérie productrice de BLSE, il y a lieu de mesurer la CMI de l'association retenue si l'infection à traiter est autre qu'une infection du tractus urinaire ou un urosepsis.</p> <p>Catégoriser «intermédiaire» l'isolat clinique catégorisé «sensible» à la piperacilline alors qu'il est catégorisé «résistant» ou «intermédiaire» à la ticarcilline (EUCAST expert rules v. 2.0, règle 9.3 de grade C). Les β-lactamases hydrolysant la ticarcilline hydrolysent également la piperacilline, mais la résistance peut être moins évidente si l'expression de la β-lactamase est faible (principalement observée chez <i>Klebsiella</i> spp. et <i>E. coli</i>). Cette règle ne s'applique pas aux associations pénicillines-inhibiteurs de β-lactamases.</p> <p>Pour <i>Proteus mirabilis</i>, catégoriser «intermédiaire» un isolat clinique apparaissant «sensible» à la ticarcilline et/ou «sensible» à la piperacilline alors qu'il est catégorisé «résistant» aux aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline) et sensible ou intermédiaire à l'amoxicilline-acide clavulanique. Cette règle ne s'applique pas au <i>Proteus mirabilis</i> producteurs de céphalosporine plasmidique.</p>						
Ampicilline	8 ¹	8	10	14 ^{A,B}	14 ^B	1/A. Les souches sauvages d'entérobactéries du groupe I (<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.) sont sensibles à l'amoxicilline. B. Ignorer la pousse fine dans la zone d'inhibition.
Ampicilline-sulbactam	8 ^{1,2}	8 ²	10-10	14 ^{A,B}	14 ^B	2. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en sulbactam est fixée à 4 mg/L.
Amoxicilline	8	8	20	19	19	
Amoxicilline-acide clavulanique	8 ^{1,3}	8 ³	20-10	19 ^{A,B}	19 ^B	3. Pour évaluer la sensibilité, la concentration d'acide clavulanique est fixée à 2 mg/L.
Amoxicilline-acide clavulanique(cystites)	32 ^{1,3}	32 ³	20-10	16 ^{A,B}	16 ^B	
Piperacilline	8	16	30	20	17	
Piperacilline-tazobactam	8 ⁴	16 ⁴	30-6	20	17	4. Pour évaluer la sensibilité, la concentration du tazobactam est fixée à 4 mg/L.
Ticarcilline	8	16	75	23	23	
Ticarcilline-acide clavulanique	8 ³	16 ³	75-10	23	23	
Mécillinam (cystites)	8	8	10	15 ^C	15 ^C	C. Ignorer les colonies situées dans la zone d'inhibition pour les isolats de l'espèce <i>E. coli</i> .
Témocilline	8	8	30	20	20	Il est recommandé d'utiliser une posologie minimale de 2g x 2/jour.

Céphalosporines	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Céfaclor	-	-		-	-	
Céfadroxil (cystites)	16	16	30	12	12	
Céfalexine (cystites)	16	16	30	14	14	
Céfazoline	-	-		-	-	
Céfépime	1	4	30	24	21	
Céfixime (cystites)	1	1	5	17	17	
Céfixime-acide clavulanique ¹ (cystites)	1	1	5/10	17	17	1. Pour la mesure de la CMI, la concentration de l'acide clavulanique est de 2 mg/L.
Céfotaxime	1	2	5	20	17	
Céfoxitine	8	16	30	19	15	
Céfoxitine (dépistage) ²	NA	NA	30	19	19	2. Le seuil épidémiologique (ECOFF) de la céfoxitine (isolat sauvage ≤ 8 mg/L) a une haute sensibilité mais une faible spécificité pour la détection des <i>Enterobacteriaceae</i> produisant une céphalosporinase (AmpC), car l'activité de cet antibiotique est aussi affectée par les altérations de perméabilité.
Cefpodoxime (cystites)	1	1	10	21	21	
Ceftaroline	0,5	0,5	5	23	23	
Ceftobiprole	0,25	0,25	5	23	23	
Ceftotolozane-tazobactam	1	1	30-10	23	23	Les concentrations critiques sont établies à partir du Ceftolozane. Pour évaluer la sensibilité, la concentration du tazobactam est fixée à 4 mg/L.
Ceftazidime	1	4	10	22	19	
Ceftibuten (cystites)	1	1	30	23	23	
Ceftriaxone	1	2	30	23	20	
Céfuroxime iv	8 ³	8	30	18	18	3. Les concentrations critiques sont en lien avec une posologie de 1,5 g 3 fois par jour pour les espèces <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> et <i>Klebsiella</i> spp. seulement.
Céfuroxime oral (cystites)	8	8	30	18	18	

Carbapénèmes	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
<p>Les concentrations critiques des carbapénèmes ont été définies de sorte que les isolats cliniques producteurs de mécanismes de résistance importants sur le plan clinique incluant la majorité des carbapénèmases chez les Enterobacteriaceae sont catégorisés «intermédiaires» ou «résistants» à ces molécules. Toutefois, certains isolats d'entérobactéries producteurs de carbapénèmases (EPC) sont catégorisés «sensibles» aux carbapénèmes et doivent être rapportés comme tels ; la présence d'une carbapénémase n'interfère pas sur la catégorisation de ces EPC. La détection des carbapénèmases est cependant recommandée sur le plan épidémiologique pour surveiller et contrôler leur diffusion.</p> <p>Il faut donc considérer comme SUSPECTE d'EPC toute souche de SENSIBILITE DIMINUEE (I/R) à au moins l'une des carbapénèmes. La détection des EPC par de simples tests phénotypiques n'est pas aisée car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité. L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. Ainsi, toute souche possédant une diminution de sensibilité à l'ertapénème [CMI > 0,5 mg/L ou une diamètre d'inhibition (disque 10 µg/ml) < 28 mm (CASFM-2013) ou < 25 mm (CASFM 2015)] par test de diffusion en gélose peut être soumise à l'algorithme de screening des souches productrices de carbapénémase (annexe 2).</p> <p>Les souches suspectes d'EPC selon cet algorithme doivent être soumises à un test de confirmation de production de carbapénémase.</p> <p>Parmi les tests de confirmation, le Hodge test (CASFM-2013) n'est plus recommandé car difficile à standardiser : présence de faux-positifs et de faux-négatifs. Parmi les autres tests de confirmations, actuellement disponibles certains, parmi lesquels des tests enzymatiques, peuvent présenter des problèmes de sensibilité (non détection des OXA-48-like qui sont les carbapénémases les plus fréquentes en France).</p>						
Doripénème	1	2	10	24	21	
Ertapénème	0,5	1	10	25 ^A	22 ^A	A. Déterminer la CMI de l'ertapénème en cas de résistance à l'ertapénème selon la méthode de diffusion en gélose.
Imipénème ¹	2	8	10	22	16	1. Un bas niveau de résistance est commun aux espèces <i>Morganella</i> spp., <i>Proteus</i> spp. et <i>Providencia</i> spp.
Méropénème	2	8	10	22	16	

Fluoroquinolones	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
La résistance aux fluoroquinolones est croisée entre les différentes molécules mais son niveau d'expression peut varier pour chaque molécule. Les isolats d' <i>Enterobacteriaceae</i> catégorisés «sensibles» à la norfloxacine sont catégorisés «sensibles» aux autres fluoroquinolones. Pour les isolats cliniques catégorisés «intermédiaires» ou «résistants» à la norfloxacine, des différences d'activité intrinsèque des autres fluoroquinolones impliquent un test et une réponse indépendante pour les autres fluoroquinolones.						
Ciprofloxacine ¹ (y compris <i>Salmonella</i> d'infection entérique)	0,5	1	5	22	19	1. Des échecs thérapeutiques ont été rapportés en cas de résistance causée par l'acquisition d'une seule mutation dans le gène <i>gyrA</i> . Si n'importe quel isolat clinique de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> est catégorisé résistant à la ciprofloxacine, il doit l'être vis-à-vis de toutes les fluoroquinolones (EUCAST expert rules v. 2.0). Ces résistances requièrent l'acquisition d'au moins deux mutations dans les gènes <i>gyrA</i> ou <i>gyrA</i> plus <i>parC</i> . Exceptionnellement, la production de l'enzyme AAC(6')-Ib-cr affecterait la ciprofloxacine sans altérer la lévofloxacine.
Ciprofloxacine ² (<i>Salmonella</i> spp.) (infection systémique)	0,06	0,06		- ^A	- ^A	2. Si la CMI de la ciprofloxacine est > 0,06 mg/L pour un isolat de <i>Salmonella</i> spp., l'isolat doit être rapporté comme étant résistant à toutes les fluoroquinolones (EUCAST expert rules v. 2.0, règle 13.6). Des données cliniques montrent une faible efficacité de la ciprofloxacine sur les infections systémiques causées par les isolats de <i>Salmonella</i> spp. présentant un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones (CMI > 0,06 mg/L). Les données disponibles concernent principalement <i>S. Typhi</i> mais des cas ont été également rapportés avec d'autres sérotypes de <i>Salmonella</i> . A. La méthode de diffusion ne permet pas la détection des bas niveaux de résistance de <i>Salmonella</i> à la ciprofloxacine. Si la salmonelle est sensible à l'acide nalidixique, l'activité de la ciprofloxacine est évaluée par la mesure de la CMI ou l'utilisation du disque de péfloxacine (voir note B).
Péfloxacine (<i>Salmonella</i> spp.) (dépistage)	-	-	5	24 ^B	24 ^B	B. Si le diamètre autour du disque de péfloxacine est ≥ 24 mm, la souche de <i>Salmonella</i> peut être catégorisée sensible à la ciprofloxacine.
Lévofloxacine	1	2	5	22	19	
Moxifloxacine	0.5	1	5	20	17	
Acide nalidixique (dépistage) ³	16	16	30	19	14	3. Les souches de <i>Salmonella</i> spp. résistantes à l'acide nalidixique doivent être catégorisées résistantes aux fluoroquinolones.
Norfloxacine	0.5	1	10	22	19	
Ofloxacine	0.5	1	5	22	19	

Aminosides	Concentrations critiques (mg/L) S ≤ R >		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm) S ≥ R <	Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition	
<p>Si l'isolat clinique est catégorisé «intermédiaire» ou «résistant» à la tobramycine et la nétilmicine, alors qu'il est catégorisé «sensible» à la gentamicine et à l'amikacine catégoriser l'isolat clinique «intermédiaire» à l'amikacine (EUCAST expert rule v. 2.0, règle 12.7). En effet, la résistance à l'amikacine n'est pas toujours détectable <i>in vitro</i> malgré la production de l'enzyme AAC(6')-I, qui est connue pour modifier l'amikacine.</p> <p>Si l'isolat clinique est catégorisé «intermédiaire» à la gentamicine et «sensible» aux autres aminosides, catégoriser l'isolat «résistant» à la gentamicine (EUCAST expert rule v. 2.0, règle 12.8). L'expression de l'enzyme AAC(3)-I peut être faible, et des isolats bactériens pourraient donc avoir une sensibilité diminuée à la gentamicine.</p> <p>Si l'isolat clinique est catégorisé «intermédiaire» à la nétilmicine alors qu'il est catégorisé «intermédiaire» ou «résistant» à la gentamicine et la tobramycine, catégoriser l'isolat «résistant» à la nétilmicine (EUCAST expert rule v. 2.0, règle 12.10). L'expression de l'enzyme AAC(3'')-II ou AAC(3'')-IV peut être faible, et des isolats bactériens pourraient donc avoir une sensibilité diminuée à la nétilmicine.</p> <p>Si l'isolat clinique est catégorisé «intermédiaire» à la tobramycine alors qu'il est catégorisé «résistant» à la gentamicine et «sensible» à l'amikacine, catégoriser l'isolat «résistant» à la tobramycine (EUCAST expert rule v. 2.0, règle 12.9). L'expression de l'enzyme ANT(2'') peut être faible, et des isolats bactériens pourraient donc avoir une sensibilité diminuée à la tobramycine.</p> <p>Chez <i>Providencia</i> spp., après vérification de l'identification, interpréter en «résistant» les résultats «sensibles» ou «intermédiaires» à la gentamicine, la tobramycine et la nétilmicine (résistance naturelle par production d'une AAC (2')-I).</p> <p>Chez <i>Serratia marcescens</i>, après vérification de l'identification, interpréter en «résistant» les résultats «sensibles» ou «intermédiaires» à la tobramycine, à l'amikacine et à la netilmicine (résistance naturelle par production d'une AAC (6')-1c).</p> <p>Les phénotypes suivants : gentamicine «résistant», tobramycine «sensible», nétilmicine «résistant» et amikacine «sensible», ou gentamicine «sensible», tobramycine «résistant», nétilmicine «résistant» et amikacine «sensible», ou gentamicine «sensible», tobramycine «sensible», nétilmicine «résistant», et amikacine «résistant» ou gentamicine «sensible», tobramycine «résistant», nétilmicine «sensible» et amikacine «résistant» demeurent improbables. Vérifier l'identification et l'antibiogramme, ainsi que l'interprétation.</p>						
Amikacine	8	16	30	16	13	
Gentamicine	2	4	10	17	14	
Netilmicine	2	4	10	15	12	
Tobramycine	2	4	10	17	14	

Tétracyclines	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Tigécycline ¹	1 ²	2 ²	15	18 ^A	15 ^A	1. La tigécycline a une activité diminuée vis-à-vis de <i>Morganella</i> spp., <i>Proteus</i> spp. et <i>Providencia</i> spp. A. Les diamètres critiques sont validés pour <i>E. coli</i> seulement. Pour les autres <i>Enterobacteriaceae</i> , il y a lieu de déterminer la CMI. 2. Pour mesurer la CMI de la tigécycline par la méthode de microdillution, le milieu doit être préparé le jour de l'utilisation.

Autres antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Chloramphénicol	8 ¹	8 ¹	30	17	17	1. Interprétation valable pour le thiamphénicol
Colistine	2 ²	2 ²		Note ^A	Note ^A	2. Interprétation valable pour la polymyxine B. A. Les diamètres d'inhibition ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises ce qui impose de déterminer la CMI en cas d'utilisation thérapeutique. Déterminer la CMI par dilution en milieu liquide (la micro-dilution est la méthode de référence). Les autres méthodes ne sont pas performantes pour cet antibiotique.
Fosfomycine IV	64	128	200	16 ^B	13 ^B	B. La résistance acquise à la fosfomycine est homogène. La présence de colonies dans la zone d'inhibition ne doit pas être prise en compte.
Fosfomycine orale (cystite)	64 ³	128 ³	200	16 ^B	13 ^B	3. Interprétation valable pour l'association fosfomycine-trométamol.
Nitrofurantoïne (cystite)	64	64	100	11	11	
Triméthoprim (cystite)	2	4	5	18	15	
Triméthoprim-sulfaméthoxazole ^{4,5}	2 ⁴	4 ⁴	1,25-23,75	16	13	4. Le ratio triméthoprim-sulfaméthoxazole est 1:19. Les concentrations critiques sont fondées sur les concentrations critiques du triméthoprim. 5. Interprétation valable pour les autres associations triméthoprim-sulfamide. La charge des disques n'étant pas adaptée, les souches isolées d'infections urinaires et catégorisées «sensibles» au triméthoprim doivent être catégorisées «sensibles» à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole).

Annexe 02. Souches *E. coli* de références utilisées.

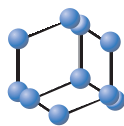
Souche	Sérogroupe	Pathovars	Groupe phylogénique
UTI 89	O18 K1 H7	UPEC	B2
CFT 073	O6 K2 H1	UPEC	B2
536 Tour	O6 K15 H31	UPEC	B2
C1845	O75 NM	DAEC	B2
E17-2	O3 H2	EAggEC	A
EDL 933	O157 H7	EHEC	E
E2348/69	O127 H6	EPEC	B2
H10407	O78 H11 K80	ETEC	A
E1286010	O143 NM	EIEC	E

Production scientifique

Article :

Meziani, D. Y., Barnich, N., Boucheham, A., Rezgoune, M. L., Benlabed, K., Rodrigues, M., & Satta, D. (2022). Identification of virulence markers and phylogenetic groups association, and Antimicrobial Susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infectious Disorders Drug Targets*. DOI: 10.2174/1871526522666220908161529.

REVIEW ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

Identification of Virulence Markers and Phylogenetic Groups' Association, and Antimicrobial Susceptibility of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates



Dahbia Yasmina Meziani^{1,*}, Nicolas Barnich², Anouar Boucheham¹, Mohamed Larbi Rezgoune¹, Kaddour Benlabeled³, Michael Rodrigues² and Dalila Satta¹

¹Molecular and Cellular Biology Laboratory, Frères Mentouri Constantine I University, B.P. 325, Ain El Bey Road, Constantine, 25000, Constantine, Algeria; ²University Clermont Auvergne, M2iSH, UMR 1071 INSERM, INRA USC 2018, Clermont-Ferrand, 63001, France; ³Microbiology Laboratory, University Hospital Center Ben Badis Constantine, 25000, Algeria

Abstract: Background: Urinary tract infections represent a world public health problem, which is caused mainly by Uropathogenic *Escherichia coli*. Although they are originally found in the intestinal microbiota in the majority of the cases, urinary tract infections can also be caused by intra-intestinal pathogenic *E. coli*.

Objective: The main objective of our research is to identify the virulence factors generally associated with different pathotypes across phylogenetic groups.

Methods: *E. coli* were isolated from patients with urinary tract infections. Antimicrobial susceptibility tests, virulence genes and phylogroups were prospected. The data analysis were performed using the *chi-square* and *Fisher* exact test.

Results: In total, 72.2% of isolates showed multidrug resistant. We have also depicted an important association between *E. coli* from inpatients with UTIs and *pap* and *hlyA* genes ($p=0.041$ and $p=0.019$ respectively). The predominant phylogenetic group in our isolates is B2 (45.4%) followed by D (12.4%). Our results showed that 9.3% of isolates have an unknown phylogroup which shows a significant association with *astA* gene ($p=0.008$). We have as well found a significant association between B2 and three virulence genes namely *pap*, *hlyA* and *invE* ($p=0.002$, $p=0.001$, $p=0.025$ respectively); B1 and *pap*, *hlyA* genes ($p=0.049$ and $p=0.021$ respectively); E and *afa* gene ($p=0.024$).

Conclusion: Certain virulence factors have been shown to be potential targets for drug design and therapeutic pathways in order to deal with the antimicrobial resistance problem enhanced by antibiotic therapy.

Keywords: Urinary tract infections, *Escherichia coli*, virulence factors, phylogenetic groups, antibiotic sensitivity test, Antimicrobial susceptibility.

1. INTRODUCTION

Escherichia coli is the most common bacterium in human and in other gastrointestinal tract animals. It is known as one of the first bacterium to colonize human newborns and is a lifelong colonizer of adults. Often, *E. coli* maintains a beneficial symbiotic relationship with its host [1]. However, there exist *E. coli* strains that have acquired virulence abilities towards their hosts by the acquisition or loss of mobile genetic elements. This is performed by the process of horizontal gene transfer (HGT), which becomes the crucial cause of bloody diarrhea for intestinal pathogenic *E. coli* (InPEC) or diarrheagenic *E. coli* (DEC), as well as infections in various organs for extra-intestinal *E. coli*

(ExPEC) [2]. InPEC bacteria include 7 pathotypes that are recognized by specific virulence factors, such as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic, *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic (Shiga toxin-producing) *E. coli* (EHEC/STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffusely-adherent *E. coli* (DAEC) and adherent invasive *E. coli* (AIEC) [3].

Among the ExPEC, uropathogenic *E. coli* strains (UPEC) are most commonly associated to human diseases and are the main cause of urinary tract infections (UTIs), with 80% of cases including cystitis and pyelonephritis [4]. In most cases, the origin of UPEC is the patient's own intestinal microbiota, indicating fecal-perineal-urethral transmission to the bladder. When UPEC colonize the bladder, they cause cystitis (lower UTI). Otherwise, if they reach the kidneys, they cause pyelonephritis (upper UTI) [5]. The urine is the most important barrier against colonization of the urinary tract by UPEC strains. Many factors of virulence in-

*Address correspondence to this author at Molecular and Cellular Biology Laboratory, Faculty of natural and life sciences, Frères Mentouri Constantine I University, 325 Ain El Bey Road, 25000, Constantine, Algeria; E-mail: dahbia-yasmina.meziani@student.umc.edu.dz

cluding adhesins, toxins, capsule, serum resistance and iron uptake systems contribute to the development of the infectious process of these strains [6]. These genes are frequently located on large pieces of DNA called 'pathogenicity islands' (PAIs) and form unstable regions of the genome of UPECs [1]. During recent years, complex hybrid pathotypes have emerged, either within the InPEC pathotypes (for example, EHEC and EAEC) or between InPEC and ExPEC pathotypes (for example, EHEC and ExPEC) rendering the barrier between pathotypes slim [2].

To understand the distribution of the *E. coli* population, phylogenetic characterization is an important tool for classifying strains and allowing a better understanding of how pathogenic strains acquired virulence genes [7]. The increase in antimicrobial resistance and the high recurrence rate make UTIs a public health problem, which demand the discovery of new therapeutic approaches, among them the specific targeting of virulence pathways. Certain virulence factors have been shown to be potential targets for drug design and therapeutic intervention.

In this study, we investigated the genetic profile related to virulence genes in UPEC isolated from Algerian patients with UTIs. Highlighting the involvement of virulence factors related to UPEC pathotype, including the *pap* and *hlyA* genes and others normally linked to InPEC pathotypes which are: *afa* (DAEC *afa/dr*), *ST1* (ETEC), *invE* (EIEC), *stx1*, *stx2* (EHEC/STEC), *eaeA* (EHEC, EPEC) and *astA* (EAEC). Our objective is to determine if UPEC expresses only virulence markers typical to pathotype or if other markers generally related to InPEC pathotypes are expressed as much. Thus, better understanding the distribution of virulence factors in order to target those that could be part of the panel of a possible vaccine. Subsequently, identifying the phylogenetic group could lead to a better determination of the pathogenicity of the strains as well as understanding the relationship between phylogroups and pathotype.

2. MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in the laboratory M2iSH, UMR 1071 INSERM, INRA USC 2018, University Clermont Auvergne, France. Otherwise, *E. coli* strains were obtained from ambulatory and hospital urine samples from patients with clinical symptoms of UTI in the laboratory of Bacteriology at the University Hospital Center Ben Badis Constantine, Algeria.

Patients from different age groups and sex were included in this study. An informed consent was signed by the participants in this study, which has been approved by the ethics committee of the Faculty of Science of Nature and Life.

In order to characterize *E. coli* strains, samples were primarily inoculated in pre-enrichment media, then streaked on Hektoen medium and incubated for 24 h at 37 °C for morphological and cultural identification. Standard conventional biochemical tests for the identification of the isolates were performed on colonies from primary cultures. The *E. coli* isolates detected and tested were stored in-vitro containing a preservation medium (Dimed).

The antimicrobial susceptibility testing of the isolates was performed in-vitro by Kirby-Bauer disc diffusion meth-

od. It was performed on Mueller-Hinton (Pasteur institute in Algiers) and interpreted according to the recommendations of CLSI [8]. Detection of colistin sensitivity was performed by the determination of the MIC with broth microdilution (BMD) according to the ISO standard 20776-1 [9]. The following antimicrobial agents were used with their respective concentration: amoxicillin (AMX) (25 µg), amoxicillin-clavulanate (AMC) (20/10 µg), ticarcillin (TIC) (75 µg), piperacillin (PIP) (100 µg), cefazolin (CFZ) (30 µg), cefoxitin (FOX) (30 µg), cefotaxime (CTX) (30 µg), ceftazidime (CAZ) (50 µg), imipenem (IPM) (10 µg), fosfomycine (FOS) (50 µg), gentamicin (GEN) (10 µg), amikacin (AMK) (30 µg), nalidixic acid (NAL) (30 µg), ciprofloxacin (CIP) (5 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) (1.25/23.75 µg), chloramphenicol (CHL) (30 µg), nitrofurantoin (NIT) (300 µg). These antibiotics were also tested on the reference strain *E. coli* ATCC 25922 Microbiology Laboratory of The University Hospital Center Ben Badis Constantine for proper interpretation of results.

DNA extraction was performed using a heat shock method. *E. coli* strains were grown in 10 ml of Luria broth at 37 °C for 24 h, and the entire volume of the culture broth obtained was centrifuged. The pellet was taken up with 1 ml of distilled water, then incubated at 95 °C for 15 min and centrifuged; the supernatant was recovered and stored at -20 °C as a template DNA stock. The detection of 9 virulence genes was inspected using PCR analysis in our strains, and amplification of bacterial DNA was performed using a total mixture volume of 20 µl; Each reaction mixture contained: 2 µl of the supernatant, 0.5 µl of each primer (Eurogentec®) and 4 µl of 5x FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne®) containing Taq polymerase, buffer (0,4 M Tris-HCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 0,1% w/v Tween-20), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Blue dye and Yellow dye. Primer sequences, predicted sizes of amplified products and annealing temperatures (AT) used in this study are listed in Table 1.

The classification of our isolated *E. coli* in different phylogroups was performed using the method described by Clermont *et al.* [10]. This method is based on the genotyping of the genes: *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* and *trpA*, the obtained results will allow us to affiliate the *E. coli* strains to seven phylogroups (A, B1, B2, C, D, E and F). Primer sequences and sizes of PCR products used in the extended quadruplex phylo-typing method are listed in Table 2.

The descriptive statistical analysis was performed using SPSS V21. All data: Patient's sex, age, virulence genes and phylogroups were analyzed using the *Chi-Square* test, and *Fisher* exact test. a *p-value* < 0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

Among a total of 352 urine samples from patients with urological symptoms of UTI (urinary urgency, urgency incontinence, dysuria, painful bladder, flank pain, back pain and for children less than 2 years: fever, diarrhea, vomiting, mild jaundice and other non-specific symptoms), 97 samples were considered positive for UTI because only *E. coli* were cultured at a concentration $\geq 10^5$ CFU/ml and was identified by biochemical tests. From these strains, 64.9%

Table 1. Characteristics of PCR assays.

Virulence Factor	Gene	Primer Sequence (5'→3')	PCR Product (bp)	AT (°C)
Pili associated with pyelonephritis	<i>pap</i>	pap(F) : GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328	56
		pap(R) : ATATCCTTCTGCAGGGATGCAATA		
Hemolysin	<i>hlyA</i>	hly(F) : AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	60
		hly(R) : ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
Afmibrial adhesins	<i>afa</i>	afa(F) : GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	750	62
		afa(R) : CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG		
EAEC heat-stable enterotoxin1 (EAST-1)	<i>astA</i>	astA(F) : ATGCCATCAACACAGTATAT	110	55
		astA(R) : GCGAGTGACGGCTTTGTAGT		
Shiga toxin 1	<i>stx1</i>	stx1(F) : ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	58
		stx1(R) : AGAACGCCCACTGAGATCATC		
Shiga toxin 2	<i>stx2</i>	stx2(F) : GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC	255	58
		stx2(R) : TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
Intimin	<i>eaeA</i>	eaeA(F) : GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	56
		eaeA(R) : CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
Heat-stable enterotoxin	<i>ST1</i>	ST(F) : TTTCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG	160	53
		ST(R) : GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG		
Regulator for cell invasion	<i>invE</i>	invE(F) : ATATCTCTATTTCACATCGCGT	382	55
		invE(R) : GATGGCGAGAAATTATATCCCG		

Table 2. Primer sequences and sizes of PCR products used in the extended quadruplex phylo-typing method.

PCR Reaction	Target	Primer ID	Primer Sequence (5'→3')	PCR Product (bp)
Quadruplex	<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
		ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG	211
		yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
	<i>TspE4.C2</i>	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
		TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
	<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
		ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA	
Group E	<i>arpA</i>	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAAATATGCC	301
		ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
Group C	<i>trpA</i>	trpAgpC.1	AGTTTATGCCAGTGCAGAG	219
		trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC	
Internal control	<i>trpA</i>	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489
		trpBA.r	GCAACGCGGCTGGCGGAAG	

Table 3. Antimicrobial susceptibility patterns of *E. coli* isolates.

Antimicrobial Agents	Resistance		Intermediate		Susceptible	
	No	%	No	%	No	%
-						
Amoxicillin	83	85.6	0	-	14	14.4
Amoxicillin-clavulanate	67	69.1	1	1	29	29.9
Ticarcillin	83	85.6	0	-	14	14.4
Piperacillin	81	83.5	0	-	16	16.5
Cefazolin	35	36.1	0	-	62	63.9
Cefoxitin	5	5.2	1	1	91	93.8
Cefotaxime	25	25.8	1	1	71	73.2
ceftazidime	21	21.6	1	1	75	77.3
Imipenem	2	2.1	0	-	95	97.9
Fosfomycine	10	10.3	1	1	86	88.7
Gentamicin	33	34	0	-	64	66
Amikacin	12	12.4	5	5.1	80	82.5
Nalidixic acid	39	40.2	0	-	58	59.8
Ciprofloxacin	30	30.9	0	-	67	69.1
Trimethoprim-sulfamethoxazole	45	46.4	0	-	52	53.6
Chloramphenicol	14	14.4	3	3.1	80	82.5
Nitrofurantoin	15	15.5	4	4.1	78	80.4
Colistin	2	2.1	0	-	95	97.9

(n=63) were from females and 35.1% (n=34) from males with UTI. The mean age was 55.8 years; 51.6 years for females and 60.1 years for males. On all strains, 22.7% (n=22) were from infants under 2 years of age. All isolates of *E. coli* were subjected to the same antimicrobial susceptibility test. Under the same conditions, the profiles obtained show that the highest resistance was to amoxicillin and ticarcillin (85.6%) followed by piperacillin (83.5%), Amoxicillin-clavulanate (69.1%), Trimethoprim-sulfamethoxazole (46.4%). The lowest resistances were 2.1% for imipenem and colistin (Table 3). In this study, 72.2% (n=70) of isolates were considered multidrug resistant (MDR).

Ten isolates were susceptible to all studied antibiotics studied. Isolates resistant to all studied antibiotics were not observed.

In our studied samples, 84.5% of isolates had at least one of the prospected virulence genes, while, 15.5% did not show any presence of these genes. The *astA* gene was detected with the highest prevalence (47.4%), followed by *hlyA* (41.2%), *pap* (36.1%), *afa* (24.7%) and the lowest frequency was of *invE* gene with 4.1%. The genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *ST1* were negative for all strains studied (Fig. 1).

The most common profile detected were *astA+* in 13 strains followed by two-genes associations *pap+hlyA+* detected in 12 strains and *hlyA+astA+* on 11 strains,

pap+astA+ and *afa+astA+* were found in 5 strains. Three-genes associations *pap+hlyA+astA+* were found in 6 strains and *hlyA+afa+astA+* in 2. Only one showed the presence of 5 genes *pap+hlyA+afa+astA+invE+* (Table 4).

The number of UPEC strains isolated was higher in hospitalized patients 63.9% (n=62) than in outpatients 36.1% (n=35). In Table 5, there was a significant association between *E. coli* from inpatients with UTIs and *pap* and *hlyA* genes (p=0.041 and p=0.019 respectively).

Phylogenetic grouping was determined by the following genes; *arpA* (400 bp), *chuA* (288 bp), *yjaA* (211 bp) and *TspE4C2* (152 bp) (Fig. 2). The predominant phylogenetic group in our study was B2 (45.4%) followed by D (12.4%), B1 (11.3%), E (9.3%), C (8.3%), F (3.1%) and A (1%). It was observed that for 9.3% of isolates and phylogrouping gave unknown results. In phylogroup B2, the prevalence of virulence genes was significantly higher, with a frequency of 95.5% within strains that had at least one virulence gene (p=0.006) (Table 6). The same phylogroup showed a significant association with three virulence genes namely *pap*, *hlyA* and *invE* (p=0.002, p=0.001, p=0.025 respectively) (Table 7).

Furthermore, there was a significant association, presented in Table 7, between B1 and *pap*, *hlyA* genes (p=0.049 and p=0.021 respectively); E and *afa* gene (p=0.024).

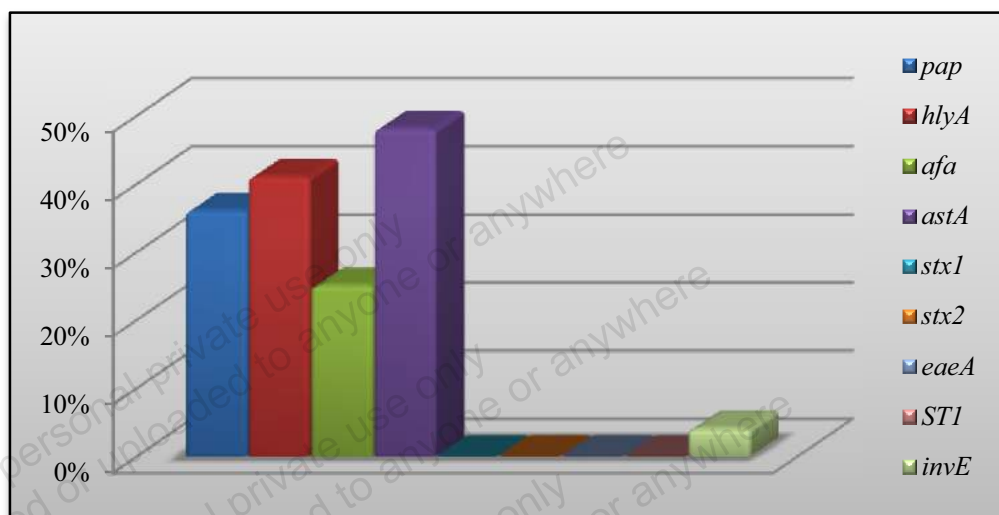


Fig. (1). Prevalence of virulence genes. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Table 4. Phenotypic profile of virulence genes.

Virulence Genes Profile	No. of Genes	No. of Strains (n = 97)	
		No	%
Absence of gene	0	15	15.5
<i>pap</i> ⁺	1	7	7.2
<i>hlyA</i> ⁺	1	3	3.1
<i>afa</i> ⁺	1	10	10.3
<i>astA</i> ⁺	1	13	13.4
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺	2	12	12.4
<i>pap</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺	2	2	2.1
<i>pap</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	2	5	5.2
<i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺	2	1	1
<i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	2	11	11.3
<i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	2	5	5.2
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	3	6	6.2
<i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	3	2	2.1
<i>hlyA</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	3	1	1
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺	4	1	1
<i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	4	1	1
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	4	1	1
<i>pap</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>afa</i> ⁺ <i>astA</i> ⁺ <i>invE</i> ⁺	5	1	1

Table 5. Prevalence of the virulence genes in ambulatory and hospitalized patients.

Gene		Strains from Inpatients (n=62)	Strains from Outpatients (n=35)	X ²	p-value
<i>astA</i>	Present	27	19	1.03	0.309
	Absent	35	16		
<i>hlyA</i>	Present	31	9	5.45	0.019
	Absent	31	23		
<i>pap</i>	Present	27	8	4.15	0.041
	Absent	35	27		
<i>afa</i>	Present	15	9	0.03	0.867
	Absent	47	26		
<i>invE</i>	Present	3	1	0.22	0.637
	Absent	59	34		



Fig. (2). Phylogroup classification on agarose gel electrophoresis of strains 1 to 12 studied. (Lane M, 1kb smart ladder, lane 1-12, amplified PCR product). Phylogroup genes *arpA* (400pb), *chuA* (288pb), *yjaA* (211pb), *TspE4C2* (152pb). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Table 6. Distribution of phylogenetic groups with at least one virulence gene.

Phylogenetic Groups	Strains with at Least One Virulence Gene		Strains without Virulence Gene		X ²	p-value
	No	%	No	%		
A	1	100	0	0	0.18	0.667
B1	5	45.5	6	54.5	14.50	0.0001
B2	42	95.5	2	4.5	7.34	0.006
C	6	75	2	25	0.61	0.436
D	8	66.7	4	33.3	3.34	0.067
E	8	88.9	1	11.1	0.14	0.704
F	3	100	0	0	0.57	0.451
Unknown	9	100	0	0	1.81	0.177

Table 7. Association between virulence genes and phylogenetic groups.

Phylogroups		Virulence Genes																			
		<i>astA</i>				<i>hlyA</i>				<i>pap</i>				<i>afa</i>				<i>invE</i>			
		Present	Absent	X ²	P-value	Present	Absent	X ²	P-value	Present	Absent	X ²	P-value	Present	Absent	X ²	P-value	Present	Absent	X ²	P-value
A	Present	1	0	1.12	0.289	0	1	0.71	0.399	0	1	0.57	0.450	0	1	0.33	0.564	0	1	0.04	0.834
	Absent	45	51			40	56			35	61			24	72			4	92		
B1	Present	5	6	0.02	0.889	1	10	5.29	0.021	0	11	3.86	0.049	1	10	1.63	0.201	0	11	0.53	0.465
	Absent	41	45			39	47			23	63			23	63			4	82		
B2	Present	20	24	0.13	0.723	26	18	10.59	0.001	23	21	9.15	0.002	11	33	0.00	0.957	4	40	5.03	0.025
	Absent	26	27			14	39			12	41			13	40			0	53		
C	Present	4	4	0.02	0.878	1	7	2.97	0.084	1	7	2.10	0.147	1	7	0.70	0.363	0	8	0.38	0.540
	Absent	42	47			39	50			34	55			23	66			4	85		
D	Present	3	9	2.76	0.096	4	8	0.35	0.552	2	10	2.24	0.134	4	8	0.54	0.461	0	12	0.59	0.442
	Absent	43	42			36	49			33	52			20	65			4	81		
E	Present	3	6	0.79	0.374	3	6	0.23	0.631	4	5	0.30	0.583	5	4	5.06	0.024	0	9	0.43	0.513
	Absent	43	45			37	52			31	57			19	69			4	84		
F	Present	2	1	0.46	0.497	0	3	2.17	0.140	2	1	1.26	0.262	0	3	1.02	0.313	0	3	0.13	0.715
	Absent	44	50			40	54			33	61			24	70			4	90		
Unknown	Present	8	1	6.84	0.008	5	4	0.84	0.359	3	6	0.03	0.856	2	7	0.03	0.854	0	9	0.43	0.513
	Absent	38	50			35	53			32	56			22	66			4	84		

4. DISCUSSION

In this section, we discuss and compare our results with similar studies in the literature. We found that the frequency of urinary tract infections among female patients is higher than the frequency found in male. Our findings are in agreement with other previously reported studies in this field [11-15], which state an incidence around four-times higher in females compared to male patients. This difference is mainly explained by the shorter length of urethra and a shorter distance between anus and urethral opening in females [5].

Our results showed that 22.7% of infants less than 2 years old had UTI, confirming that neonates and infants are more suggested to be affected. This vulnerability is due to an incomplete development of their immune system [16, 17].

Table 3 shows a significant correlation between *E. coli* from inpatients with UTIs and *pap* and *hlyA* genes ($p=0.041$ and $p=0.019$ respectively), which could be considered potential biomarkers. The high frequency of hospitalized patients compared to outpatients observed in our population is in agreement with studies conducted in Tunisia [6] and Germany [18]. One of the risk factors for UTIs is prolonged catheter usage, which accounts for up to 80% of nosocomial infections [19], largely because of the ability of bacteria to

establish a biofilm on the catheter that resists clearance of host defense and antibiotics [20].

The variations in the percentages across regions and countries vary according to their specificities related to their habits of increased consumption of antibiotics. Accordingly, the results of the antimicrobial susceptibility test shown in this study depict that 72.2% of isolates were considered MDR with high resistance to amoxicillin 85.6%, which is comparable to a study conducted in Iraq, 93.62% [21]. Followed by piperacillin 83.5%, very similar to the study conducted in China, 76.8% [11], but higher than the study conducted in Romania, 19.18% [13]. In our study, the rate of resistance to Amoxicillin-clavulanate was 69.1%, which is lower than studies conducted in Iraq, 96.45% [21] and Egypt, 86.7% [22]. But higher than studies conducted in Ethiopia, 29% [15], Thailand, 36.5% [12] and Turkey, 27.8% [14]. The low frequency of resistance to imipenem (2.1%) found in this study was almost similar in others studies conducted in China, with 1% rate [11], Romania 0.12% [13], Iraq 2.84% [21], Ethiopia 0% [15], Thailand 1.4% [12], and Turkey 3.2% [14]. This confirms the fact that antimicrobial resistance is increasing in UTIs treatments.

Another interesting result found by conducting this study is the high frequency of *astA* gene 47.42% with 13 strains having only this virulence marker, compared to studies conducted in Mexico which found, 33.5% [23], Iran, 21.14%

[24] and Germany with 8.7% [18]. Often associated with diarrhea in children, the *astA* genes are usually linked to Enteroaggregative *E. coli* and appear to be one of the most frequently expressed DEC genes in UPEC. Therefore, they have the potential to cause urinary tract infections and are sometimes associated with genes of classical UPEC virulence markers [25, 26]. Improving the results obtained in our study shows a high frequency of gene association hly^+astA^+ , followed by association pap^+astA^+ .

Regarding uropathogenic virulence factors, our results show that 41.24% of isolated *E. coli* carried *hlyA* gene which is comparable to studies conducted in Pakistan, 37% [27], Norway, 39% [28], Ethiopia, 51.5% [15] and Iran, 50.41% [24]. In fact, approximately 40–50% of *E. coli* isolates from patients with a UTI encode toxin α -hemolysin, which leads to cell lysis by forming pores in the host cells [29]. However, many other studies showed lower rates conducted in Mongolia, 8.1% [30], Romania, 12.45% [13], Tunisia, 19% [6], China, 11.6% [11], Iran, 15.6%, [31], Turkey, 3.3% [14], Egypt, 0.9% [32], Poland, 18.5% [33], Russia, 26% [28], Romania, 18% [34], Mexico, 15.4% [23], Turkey, 1.3% [35] and Iran, 1.4% [36].

Pili associated with pyelonephritis are known especially for their role to allow UPECs binding with the host cells and tissues. At this point, our results are in agreement with studies conducted in South Korea, 39.6% [37], Romania, 36% [34], Brazil, 32% [38], Ethiopia, 29.5% [15], Poland, 38.7% [33] and Tunisia, 41% [6]; but lower than study conducted in Thailand, 79.3% [12]. Moreover, our results show a higher frequency of gene association pap^+hlyA^+ and there was a significant association between the presence of *pap* and *hlyA* genes with two phylogroups B1 ($p=0.049$, $p=0.021$ respectively) and B2 ($p=0.002$, $p=0.001$ respectively) that confirms that both genes are often genetically linked and grouped with others virulence factors on regions of PAIs, which have probably been acquired by horizontal gene transfer [1].

Afa, a group of adhesins belonging to Dr. Family are expressed by both intestinal pathogens DAEC and UPEC strains. Epidemiological studies show that *E. coli* isolates expressing Afa/Dr adhesins are involved in cystitis in children with 25% to 50% [39]. Interestingly, in our results, *afa* was found in only one strain among all children isolated. Furthermore, the *afa* gene was detected in 24.74% from our *E. coli* isolates which is in adequacy with studies conducted in Iraq, 28.07% [21], Tunisia 20% [6], Romania 38.24% [13] and Turkey 16.6% [14]; but higher than studies conducted in Poland 4.6% [33], Thailand 7.7% [12], South Korea 8.6% [37] and Iran 8.13% [24].

The low frequency of *invE* and total absence of genes coding for shiga toxin 1 and 2, intimin and ST1 toxin, is not due to failure of our process. We affirm that the controls of genes were PCR-positive for each gene sought. We show across this result that the incidence of UTIs caused by InPECs is quite low. To our knowledge, only one study conducted by Yılmaz *et al.* [35] has obtained almost similar results. The absence of these genes could be due to the inactivation or deletion of genetic sequences when integrating plasmids or phage genomes into a bacterial genome, which could lead to a negative PCR.

Among the *E. coli* strains studied, 15.46% don't have virulence genes, which does not mean that they are commensal. Since, they may carry other genes that are not prospected in our study, which could give them the character of the pathogen.

In our study, we find that the prevalent phylogroup is B2 (45.36%) followed by D (12.37%). Molecular analysis of *E. coli* strains isolated from UTIs is phylogenetically distinct from commensal strains; these strains frequently belong largely to B2 phylogroup and in second place to D phylogroup. These phylogroups have acquired numerous pathogenic determinants over time [40]. These results are in agreement with studies conducted in Poland B2: 38.1%, D: 35.3% [33], Iran B2: 55%, D: 21% [36], Mongolia B2: 33.8%, D: 28.4% [30], Norway B2: 45%, D: 39% [28], Danmark B2: 67%, D: 13% [41], South Korea B2: 79.31%, D: 15.51% [37] and Ethiopia B2: 30%, D: 27.5% [15]. In further studies in the literature, the dominant phylogroup was A [22, 28, 32] and in others, it was D [42-45].

We now discuss the relationship between phylogroups and virulence genes. Then, we found, in our study that 95.45% of the strains of group B2 have at least one of the virulence genes tested ($p=0.006$) and there was a significant association between phylogroup B2 and three virulence genes namely *pap*, *hlyA* and *invE* ($p=0.002$, $p=0.001$, $p=0.025$ respectively); which attests the strong virulence of this phylogenetic group.

Our results show that more than 9% of *E. coli* strains have an unknown phylogroup using the new Clermont phylotyping method. Furthermore, there was a significant association between these strains and *astA* gene ($p=0.008$). Unlike our findings, Clermont *et al.* found that only 1% of *E. coli* strains studied by the new quadruplex method could not be classified in one of the phylogenetic groups [10]. In agreement with that, a study conducted by Tewawong *et al.* [12] showed that 1.4% *E. coli* strains were unassignable. Whereas other studies conducted in Iran; by Iranpour *et al.* [46] and Boroumand *et al.* [47] demonstrated that 27.1% and 20.2%, respectively of *E. coli* isolated from patients with urinary tract infection remained unclassified. This indicates that other phylogroups could be discovered in the future and the ratio of unknown strains differs according to their geographical distribution and population features.

CONCLUSION

Our findings showed that the most predominant virulence markers among the isolated *E. coli* from our patients with UTIs are *astA*, followed by *hlyA*, *pap*, *afa*, *invE*, respectively. A total absence of *eaeA*, *stx1*, *stx2*, and *STI* genes within studied strains has been observed. There was a significant association between *E. coli* from inpatients with UTIs and *pap* and *hlyA* genes. The most common phylogenetic group was B2 with a high prevalence of the virulence determinants. Other important associations have been depicted between B2 and *pap*, *hlyA* and *invE* genes; B1 and *pap*, *hlyA* genes; E and *afa* genes. Our study outperforms the standard rate of phylogenetically unclassifiable strains mentioned in other reports as well as shows a significant association with *astA* gene. The emergence of hybrid pathotypes leads us to prospect other virulence markers that were

not being considered yet, so a complete genetic profile is realized.

A better characterization of UPEC strains, identifying and screening for virulence factors will improve the diagnosis of UPEC strains and provide alternative therapeutic solutions against UTIs in order to cope with the antimicrobial resistance enhanced by antibiotic therapy.

LIST OF ABBREVIATIONS

<i>afa</i>	=	Afimbrial Adhesins
AIEC	=	Adherent Invasive <i>E. coli</i>
<i>astA</i>	=	EAEC Heat-Stable Enterotoxin1 (EAST-1)
AT	=	Annealing Temperatures
bp	=	Base Pair
CFU	=	Colony Forming Unit
CLSI	=	Clinical and Laboratory Standards Institute
DAEC	=	Diffusely-Adherent <i>E. coli</i>
DEC	=	Diarrheagenic <i>E. coli</i>
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	=	Deoxynucleoside Triphosphates
<i>eaeA</i>	=	Intimin
EAEC	=	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	=	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EIEC	=	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	=	Enteropathogenic, <i>E. coli</i>
ETEC	=	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
ExPEC	=	Extra-Intestinal <i>E. coli</i>
HGT	=	Horizontal Gene Transfer
<i>hlyA</i>	=	Hemolysin
<i>invE</i>	=	Regulator for Cell Invasion
InPEC	=	Intestinal Pathogenic <i>E. coli</i>
Kb	=	Kilo Base
MDR	=	Multidrug Resistant
PAIs	=	Pathogenicity Islands
<i>pap</i>	=	Pili Associated with Pyelonephritis
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
<i>ST1</i>	=	Heat-Stable Enterotoxin
STEC	=	Shiga Toxin-producing <i>E. coli</i>
<i>Stx1</i>	=	Shiga Toxin 1
<i>Stx2</i>	=	Shiga Toxin 2
UPEC	=	Uropathogenic <i>E. coli</i>
UTI	=	Urinary Tract Infection

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The ethics committee of the Faculty of Science of Nature and Life has approved the study.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used for studies that are basis of this research. The use of human urine samples and the protocol in this study strictly conformed to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. We work in accordance with the Declaration of Helsinki (1964): Ethical principles applicable to medical research on human subjects and in accordance with the recommendations of the Algerian national council for ethics in health sciences.

CONSENT FOR PUBLICATION

Informed consent (written) was obtained from all participants and from parents and/or legal guardians in the case of minor participants.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The datasets generated and/or analyzed during the current study are not publicly available due to the nature of this research, participants of this study did not agree for their data to be shared publicly, so supporting data is not available, but is available from the corresponding author [DYM], on reasonable request.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Youcef Bourouied for his help. We thank the staff at the M2iSH laboratory of University Clermont Auvergne and Microbiology Laboratory of the University Hospital Center Benbadis Constantine for technical support.

REFERENCES

- Desvaux M, Dalmasso G, Beyrouthy R, Barnich N, Delmas J, Bonnet R. Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2020; 11: 2065. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065> PMID: 33101219
- Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19(1): 37-54. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x> PMID: 32826992
- Rojas-Lopez M, Monterio R, Pizza M, Desvaux M, Rosini R. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine development. *Front Microbiol* 2018; 9: 440. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440> PMID: 29615989
- Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16(1): 100-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.005> PMID: 23403118
- Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2015; 3(4): 10-1128. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012> PMID: 26350328
- Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from pa-

- tients with urinary tract infection. *Int J Infect Dis* 2013; 17(6): e450-3.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.01.025> PMID: 23510539
- [7] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(10): 4555-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000> PMID: 11010916
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI supplement M100. 29th ed. Wayne, PA: CLSI 2019.
- [9] International Standards Organization. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems d Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. 2006; 20776e1.
- [10] Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5(1): 58-65.
<http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12019> PMID: 23757131
- [11] Wang Y, Zhao S, Han L, et al. Drug resistance and virulence of uropathogenic *Escherichia coli* from Shanghai, China. *J Antibiot* 2014; 67(12): 799-805.
<http://dx.doi.org/10.1038/ja.2014.72> PMID: 24984795
- [12] Tewawong N, Kowaboot S, Pimainog Y, Watanagul N, Thongmee T, Poovorawan Y. Distribution of phylogenetic groups, adhesion genes, biofilm formation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand. *PeerJ* 2020; 8: e10453.
<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.10453> PMID: 33344087
- [13] Cristea VC, Gheorghe I, Czobor Barbu I, et al. Snapshot of phylogenetic groups, virulence, and resistance markers in *Escherichia coli* uropathogenic strains isolated from outpatients with urinary tract infections in Bucharest, Romania. *BioMed Res Int* 2019; 5712371.
<http://dx.doi.org/10.1155/2019/5712371> PMID: 31236408
- [14] Düzgün AÖ, Okumuş F, Saral A, Çiçek AÇ, Cinemre S. Determination of antibiotic resistance genes and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from Turkish patients with urinary tract infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2019; 52: e20180499.
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0499-2018> PMID: 31271618
- [15] Dadi BR, Abebe T, Zhang L, Mihret A, Abebe W, Amogne W. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2020; 20(1): 108.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-020-4844-z> PMID: 32033541
- [16] Montini G, Tullus K, Hewitt I. Febrile urinary tract infections in children. *N Engl J Med* 2011; 365(3): 239-50.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1007755> PMID: 21774712
- [17] Chang SL, Shortliffe LD. Pediatric urinary tract infections. *Pediatr Clin North Am* 2006; 53(3): 379-400.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2006.02.011> PMID: 16716786
- [18] Toval F, Köhler CD, Vogel U, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2014; 52(2): 407-18.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02069-13> PMID: 24478469
- [19] Parker V, Giles M, Graham L, et al. Avoiding inappropriate urinary catheter use and catheter-associated urinary tract infection (CAUTI): A pre-post control intervention study. *BMC Health Serv Res* 2017; 17(1): 314.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12913-017-2268-2> PMID: 28464815
- [20] Rowe TA, Juthani-Mehta M. Urinary tract infection in older adults. *Aging Health* 2013; 9(5): 519-28.
<http://dx.doi.org/10.2217/ahc.13.38> PMID: 24391677
- [21] Ibrahim MS, Khalid HM, Mero WMS. Molecular characterization of some virulence genes and antibiotic susceptibility pattern among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patient in Zakho City/Iraq. *Zanco J Pure Appl Sci* 2020; 32(2): 167-77.
- [22] El-Mahdy R, Mahmoud R, Shrief R. Characterization of *E. coli* phylogroups causing catheter-associated urinary tract infection. *Infect Drug Resist* 2021; 14(14): 3183-93.
<http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S325770> PMID: 34429618
- [23] Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Rodríguez-Moctezuma JR, Domínguez-Trejo P, Vaca-Paniagua F, Vaca S. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *J Microbiol Immunol Infect* 2017; 50(4): 478-85.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2015.08.005> PMID: 26433755
- [24] Momtaz H, Karimian A, Madani M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12(1): 8.
<http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-12-8> PMID: 23627669
- [25] Herzog K, Engeler Dusel J, Hugentobler M, et al. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infection* 2014; 42(2): 441-4.
<http://dx.doi.org/10.1007/s15010-013-0569-x> PMID: 24323785
- [26] Boll EJ, Struve C, Boisen N, Olesen B, Stahlhut SG, Krogfelt KA. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect Immun* 2013; 81(4): 1164-71.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01376-12> PMID: 23357383
- [27] Bashir S, Haque A, Sarwar Y, Ali A, Anwar M. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012; 11(1): 23.
<http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-11-23> PMID: 22867028
- [28] Grude N, Potaturkina-Nesterova NI, Jenkins A, et al. A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(2): 208-11.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01584.x> PMID: 17328737
- [29] Nagamatsu K, Hannan TJ, Guest RL, et al. Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(8): E871-80.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1500374112> PMID: 25675528
- [30] Munkhdelger Y, Gunregjav N, Dorjpurev A, Juniichiro N, Sarantuya J. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *J Infect Dev Ctries* 2017; 11(1): 51-7.
<http://dx.doi.org/10.3855/jidc.7903> PMID: 28141590
- [31] Pourzare M, Derakhshan S, Roshani D. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Sanandaj, Iran. *Arch Pediatr Infect Dis* 2017; 5: e41995.
<http://dx.doi.org/10.5812/pedinfect.41995>
- [32] Khairy RM, Mohamed ES, Abdel Ghany HM, Abdelrahim SS. Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrheagenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One* 2019; 14(9): e0222441.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0222441> PMID: 31513642
- [33] Kot B, Wicha J, Grużewska A, Piechota M, Wolska K, Obreńska M. Virulence factors, biofilm-forming ability, and antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. *Turk J Med Sci* 2016; 46(6): 1908-14.
<http://dx.doi.org/10.3906/sag-1508-105> PMID: 28081347
- [34] Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *J Cell Mol Med* 2001; 5(3): 303-10.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00164.x> PMID: 12067489
- [35] Yılmaz EŞ, Aslantaş Ö. Phylogenetic group/subgroups distributions, virulence factors, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* Strains from urinary tract infections in Hatay. *Rev Soc Bras Med Trop* 2020; 53: e20190429.
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0429-2019> PMID: 32049204
- [36] Rezatofighi SE, Mirzarazi M, Salehi M. Virulence genes and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infection and uninfected control subjects: A case-control study. *BMC Infect Dis* 2021; 21(1): 361.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-021-06036-4> PMID: 33865334
- [37] Lee JH, Subhadra B, Son YJ, et al. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol* 2016; 62(1): 84-90.

- <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12517> PMID: 26518617
- [38] Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a University Hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2006; 48(4): 185-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652006000400002> PMID: 17119672
- [39] Servin AL. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(4): 823-69. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00036-14> PMID: 25278576
- [40] Picard B, Garcia JS, Gouriou S, *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 1999; 67(2): 546-53. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.67.2.546-553> PMID: 9916057
- [41] Ejrnæs K, Stegger M, Reisner A, *et al.* Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence* 2011; 2(6): 528-37. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.6.18189> PMID: 22030858
- [42] Themphachanal M, Kongpheng S, Rattanachuay P, Khiangam S, Singkhamanan K, Sukhumunoon P. Molecular characterization of virulence and antimicrobial susceptibility profiles of uropathogenic *Escherichia coli* from patients in a tertiary, hospital, southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015; 46(6): 1021-30.
- [43] Robino L, García-Fulgueiras V, Araujo L, Algorta G, Pérez MC, Vignoli R. Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping. *J Glob Antimicrob Resist* 2014; 2(4): 293-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2014.08.003> PMID: 27873690
- [44] Gao Q, Zhang D, Ye Z, *et al.* Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes. *Microb Pathog* 2017; 104: 217-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.027> PMID: 28104383
- [45] Sheikh F.A, Goodarzi H, Yadyad MJ, *et al.* Virulence-associated genes and drug susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Infect Drug Resist* 2019; 12: 2039-47. <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S199764> PMID: 31410031
- [46] Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *BioMed Res Int* 2015; 2015: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/846219> PMID: 25692147
- [47] Boroumand M, Naghmachi M, Ghatee MA. Detection of phylogenetic groups and drug resistance genes of *Escherichia coli* causing urinary tract infection in Southwest Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2021; 14(2): e112547. <http://dx.doi.org/10.5812/jjm.112547>

Résumés

دراسة الجينات المسببة للأمراض لسلاسل الإشريكية القولونية

في علم الوراثة الجزيئية LMD أطروحة للحصول على درجة دكتوراه الدورة الثالثة

بكتيريا الإشريكية القولونية (*Escherichia coli* (E. coli) هي النوع السائد في الجهاز الهضمي للإنسان. وتشمل طفيليات مُمْطِعة وسلاسل مسببة للأمراض المعوية (InPEC) وخارج الأمعاء (ExPEC). تُعد الإشريكية القولونية المسببة للأمراض خارج الأمعاء ExPEC مشكلة صحية عمومية على الصعيد العالمي. تتميز بكونها بكتيريا متعددة القدرات وهي سبب الغالبية العظمى من التهابات المسالك البولية، وهي أحد الأسباب الرئيسية لتجرثم الدم لدى البالغين والسبب الثاني لالتهاب السحايا الوليدي. إن الارتفاع المُثير للقلق لمقاومة المضادات الحيوية بين سلالات ExPEC، وفشل العلاج، والاستشفاء، والوفيات، والارتفاع المتزايد تكاليف الرعاية الصحية. في هذه الدراسة، حددنا مجموعة التصنيف التفرعي الحيوي لكل سلالة واستكشفنا الشاكلة الجينية المرتبط بجينات الضراوة ضمن مجموعتين من الإشريكية القولونية المسببة للأمراض خارج الأمعاء ExPEC : المجموعة الأولى هي UPEC المعزولة من المرضى الجزائريين الذين يعانون من التهابات المسالك البولية، والمجموعة الثانية من ExPEC، تم عزلها من المرضى الجزائريين الذين يعانون من التهابات مختلفة خارج الأمعاء. الهدف الرئيسي من بحثنا هو تحديد عوامل الضراوة المرتبطة عموماً بأنماط مرضية مختلفة مرتبطة بـ ExPEC وغيرها من الأنواع المرتبطة عادةً بالأنماط المسببة للمرض InPEC. سيسمح هذا الاختيار أيضاً بالكشف عن سلالات هجينة محتملة (سلاسل مسببة للأمراض المعوية/سلاسل مسببة للأمراض خارج الأمعاء) (ExPEC / InPEC).

أظهرت نتائجنا أن جينات *astA* و *hlyA* و *pap* كانت أكثر علامات الضراوة السائدة بين المجموعتين. أظهرت النتائج الغياب التام للجينات *stx1* و *stx2* و *ST1* في جميع السلالات المدروسة. كانت مجموعة التصنيف التفرعي الحيوي الأكثر شيوعاً هي B2. كما بينت دراستنا أيضاً عن معدل أعلى للسلاسل غير القابلة للتصنيف من جانب التصنيف التفرعي الحيوي. كشفت النتائج أيضاً عن العديد من الارتباطات المعنوية بين الجينات المدروسة ومجموعات التصنيف التفرعي الحيوي المختلفة وكذلك بين الإشريكية القولونية من المرضى الذين يعانون من التهابات المسالك البولية وجينات *pap* و *hlyA* ($p=0.041$ و $p=0.019$ على التوالي). كما أظهرت النتائج وجود 14 عشر سلالة هجينة. إن التوصيف الأفضل لسلاسل الإشريكية القولونية المسببة للأمراض خارج الأمعاء ExPEC من خلال تحديد مجموعة التصنيف التفرعي الحيوي وتحديد القدرة الإراضية للسلاسل سيسمح بتحسين تشخيصها وسيوفر حلاً علاجياً بديلاً مستهدفة، وهذا لمحاولة معالجة النمو المتزايد لمقاومة المضادات الحيوية المعززة بالعلاج بالمضادات الحيوية الجهازية.

الكلمات المفتاحية : الإشريكية القولونية *Escherichia coli*، عوامل الضراوة، مجموعات الفصائل، التهابات خارج الأمعاء.

مختبر البحث : البيولوجيا الجزيئية والخلوية - جامعة قسنطينة 1

الرئيس : بن حزية ياسين - أستاذ - جامعة قسنطينة 1

المدير: رزقون محمد العربي - ام (أ) - جامعة قسنطينة 1

الممتحنون: صخري عرفة نجوى ام (أ) - جامعة قسنطينة 1

دقيش سامية - ام (أ) - جامعة مصطفى بن بولعيد - باتنة 2

Academic year : 2022 - 2023

Presented by : MEZIANI Dahbia Yasmina

Study of the pathogenicity genes of *Escherichia coli* strains

Thesis for obtaining the degree of Doctorate 3rd cycle LMD in Molecular Genetics

Escherichia coli (*E. coli*) is the predominant species of the human gastrointestinal tract. It includes commensals as well as intestinal (InPEC) and extra-intestinal (ExPEC) pathogenic strains. ExPEC is a global public health problem. They have the characteristic of being versatile bacteria and are the cause of the vast majority of urinary tract infections, one of the main causes of bacteremia in adults and the second cause of neonatal meningitis. The worrying upsurge in antibiotic resistance among ExPEC strains, treatment failure, hospitalization, mortality, and rising health care.

In this study, we identified the phylogenetic group of each strain and prospected the genetic profile linked to the virulence genes within two ExPEC groups: the first being the UPEC isolated from Algerian patients suffering from urinary tract infections. The second, that of ExPEC from Algerian patients with various extra-intestinal infections. The main objective of our research is to identify the virulence factors generally associated with different pathotypes linked to ExPEC and others normally linked to InPEC pathotypes. This selection will also make it possible to highlight any hybrid strains (ExPEC/InPEC).

Our results showed that *astA*, *hlyA* and *pap* genes were the most predominant virulence markers among the two groups. The results obtained revealed a total absence of the *stx1*, *stx2* and *ST1* genes on all the strains studied. The most commonly encountered phylogenetic group was B2. Our study also reported a higher of phylogenetically unclassifiable strains. The results also revealed diverse significant associations between studied genes and the different phylogroups as well as between *E. coli* from hospitalized patients with UTIs and the *pap* and *hlyA* genes ($p=0.041$ and $p=0.019$ respectively). The results obtained also revealed the presence of 14 hybrid strains.

A better characterization of the ExPEC strains by the identification of the phylogenetic group and the determination of the pathogenicity of the strains will make it possible to improve their diagnoses and will provide targeted alternative therapeutic solutions. This is to try to address the increased growth of antibiotic resistance reinforced by systemic antibiotic therapy.

Keywords: *Escherichia coli*, virulence factor, phylogroupes, extra-intestinales infections.

Research laboratories: Molecular and Cellular Biology - Constantine 1 University.

President: BENHIZIA Yacine - Professor - Constantine 1 University

Director: REZGOUN Mohamed Larbi - MC(A) - Constantine 1 University

Examiners: SEKHRI-ARAF A Nedjoudja - MC(A) - Constantine 1 University

DEKKICHE Samia - MC(A) - Mostefa Ben Boulaïd University - Batna 2

Étude des gènes de pathogénicité des souches d'*Escherichia coli*Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle LMD en Génétique Moléculaire

Escherichia coli (*E. coli*) est l'espèce prédominante du tractus gastro-intestinal humain. Elle comprend des commensaux ainsi que des souches pathogènes intestinales (InPEC) et extra-intestinales (ExPEC). Les ExPEC représentent un problème mondial de santé publique. Elles possèdent la caractéristique d'être des bactéries polyvalentes et sont à l'origine de la grande majorité des infections des voies urinaires, l'une des principales causes de bactériémie chez l'adulte et la deuxième cause de méningite néonatale. La recrudescence inquiétante de la résistance aux antibiotiques parmi les souches ExPEC, l'échec du traitement, l'hospitalisation, la mortalité, ainsi que des coûts croissants pour les soins de santé.

Dans cette étude, nous avons identifié le groupe phylogénétique de chaque souche et prospecté le profil génétique lié aux gènes de virulence au sein de deux groupes ExPEC : le premier étant les UPEC isolés de patients algériens atteints d'infections urinaires. le second, celui d'ExPEC issues de patients algériens atteints de diverses infections extra-intestinales. L'objectif principal de notre recherche est d'identifier les facteurs de virulence généralement associés à différents pathotypes liés aux ExPEC et d'autres normalement liés aux pathotypes InPEC. Cette sélection permettra également de mettre en évidence d'éventuelles souches hybrides (ExPEC/InPEC).

Nos résultats ont montré que les gènes *astA*, *hlyA* et *pap* étaient les marqueurs de virulence les plus prédominants parmi les deux groupes. Les résultats obtenus ont révélé une absence totale des gènes *stx1*, *stx2* et *ST1* sur toutes les souches étudiées. Le phylogroupe le plus couramment rencontré était B2. Notre étude a également rapporté un taux plus élevé de souches phylogénétiquement inclassables. Les résultats ont aussi révélés plusieurs associations significatives entre les gènes étudiés et les différents phylogroupes ainsi qu'entre les *E. coli* provenant de patients hospitalisés avec des infections urinaires et les gènes *pap* et *hlyA* ($p=0,041$ et $p=0,019$ respectivement). Les résultats obtenus ont révélé aussi la présence de 14 souches hybrides.

Une meilleure caractérisation des souches ExPEC par l'identification du groupe phylogénétique et la détermination de la pathogénicité des souches permettront d'améliorer leurs diagnostics et apporteront des solutions thérapeutiques alternatives ciblées. Cela afin d'essayer de remédier à la croissance accrue de la résistance aux antibiotiques renforcée par l'antibiothérapie systémique.

Mots-clefs : *Escherichia coli*, facteurs de virulence, phylogroupes, infections extra-intestinales.

Laboratoires de recherche : Biologie Moléculaire et Cellulaire - Université Constantine 1.

Président : BENHIZIA Yacine - Professeur - Université Constantine 1
Directeur : REZGOUN Mohamed Larbi - MC(A) - Université Constantine 1
Examineurs : SEKHRI-ARAFI Nedjoudja - MC(A) - Université Constantine 1
DEKKICHE Samia - MC(A) - Université Mostefa Ben Boulaïd - Batna 2