

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



N° d'ordre : 21/12D3C/2018
N° de série : 01/Bio/2018

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)
En Biochimie et Biotechnologie

THÈME

Apport des techniques moléculaires et bioinformatiques pour
l'identification et la caractérisation fonctionnelle de germes causant les
mammites subcliniques et les infections respiratoires chez les bovins à
Constantine et à Batna.

Présentée par : GUENDOUZE Assia

Devant le JURY

Président :	Pr. NECIB Youcef	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Directeur de thèse :	Pr. HAMIDECHI M. Abdelhafid	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	Pr. RIBA Amar	Univ. M'Hamed Bougara Boumerdès
	Dr. YAHIAOUI Bilal	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1
	Pr. KACEM CHAUCHE Noredine	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
	Dr. NOUADRI Tahar	Univ. Frères Mentouri Constantine 1

Année Universitaire 2017/2018

Remerciements

Avec tout le sens de mon éducation et de mon modeste savoir, je ne commencerai pas ce travail sans exprimer à tous et à chacun ; les chers membres du jury, l'expression de mes respects et de mes remerciements.

*Je tiens à remercier mon Directeur de thèse, le Professeur **HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid**. Je suis reconnaissante pour ses orientations, sa patience, sa confiance et ses conseils, tout au long de ce parcours scientifique. Ainsi, la pertinence de ses remarques a contribué à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit. Veuillez trouver ici, Monsieur, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour vous.*

*Je suis profondément reconnaissante vis-à-vis du Professeur **CHABRIERE Eric**, Directeur du laboratoire Bio cristallographie, biotechnologie et enzymologie structurale sis à l'URMITE (Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes), pour m'avoir accordée l'opportunité de réaliser une partie expérimentale de ma thèse et d'évoluer au sein de son équipe de recherche.*

*Mes remerciements sont adressés au président du jury : Monsieur **NECIB Youcef**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Ses conseils, comme à son habitude, apporteront un plus à cette thèse.*

*J'adresse un grand merci à Monsieur **RIBA Amar**, professeur à l'Université M'Hamed Bougara Boumerdès, qui me fait le plaisir et l'honneur de juger ce travail et pour son déplacement jusqu'à Constantine. Sa contribution me sera sans aucun doute très bénéfique, connaissant toutes ses qualités humaines et scientifiques.*

*Un grand merci à Monsieur **YAHIAOUI Bilel**, Maître de conférences à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, qui me fait l'honneur d'examiner ce travail. Son engagement à participer dans ce jury est une valeur positive ajoutée à mon travail, vue la grande expérience qu'il a accumulée en Europe.*

*Monsieur **KACEM CHAUCHE Noredine**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, est à remercier vivement pour l'honneur d'accepter d'évaluer ma thèse et de lui apporter, par ses compétences reconnues, un regard scientifique. Certainement, son expérience établie apportera des conseils et des critiques précieux pour encore améliorer ma thèse.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur **NOUADRI Tahar**, Maître de conférences à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter d'évaluer ce travail. Je voudrais, à travers ces mots, lui témoigner ma gratitude pour son engagement dans cette thèse. Ses compétences vont certainement apporter une nette amélioration à mon document de thèse.*

Je tiens également à remercier :

- *Le Professeur Maamache et Madame Oucheriah (Univ BATNA) pour leur aide à la réalisation des prélèvements.*
- *Monsieur Bouzitouna Abdelhakim, directeur du laboratoire communal d'hygiène d'Ain Smara, Constantine, au niveau duquel j'ai effectué l'isolement des bactéries, pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité.*
- *Valérie Filoza, Ahmed Djeghader, Soumeya Aliouane, Pauline Jacquet, Janek Bzdrenga, Cheikh Ibrahima lo et Haithem Sobhy pour leurs accompagnements, leurs aides et leurs conseils durant mes stages.*
- *Toutes mes amies et collègues pour leur soutien et leur disponibilité: Samira, Soumia, Hind, Hiba, Amira et Sarah.*
- *Mrs BENNOUAR Farid, LARABA Djamel et BOUFRIOUA Amar pour m'avoir aidé à réaliser la partie microbiologique au sein de notre faculté.*

Je tiens à remercier particulièrement mes très chers parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont encouragée et aidée tout au long de mes études.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes frères et mes sœurs.

Merci à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

LISTE DES ACRONYMES

AHL : N-Acyl-Homosérine Lactone

AI : Auto-Inducteur

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn : BLAST Nucleotide

CMT: California Mastitis Test

dNTP : déoxyribonucléotides-triphosphate

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry.

MLST: MultiLocus Sequence Typing.

MSP: Main Spectra Projection.

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PLL: Phosphotriesterase-Like Lactonase

QQ: « *Quorum* Quenching » = extinction du *quorum*

QS : « *Quorum* Sensing » = détection du *quorum*

QSI : Inhibiteur de *Quorum* Sensing

SAM: radical S-Adenosyl Méthionine

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

TFA : TriFluoroacetic Acid.

Tm : Température de demi-dénaturation

LISTE DES FIGURES, ORGANIGRAMMES ET DIAGRAMMES

Figure 1: Schéma de l'anatomie de la glande mammaire.....	5
Figure 2: Fonctionnement de la technique MALDI-TOF MS.....	12
Figure 3 : Régulation de la virulence et interactions entre les deux systèmes de QS las et Rhl chez <i>P. aeruginosa</i>	17
Figure 4 : Structures des signaux QS utilisés par <i>P. aeruginosa</i>	18
Figure 5 : Synthèse des N-Acyl-Homosérine Lactone	19
Figure 6 : Modèle de formation d'un biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 7: Types d'activité enzymatique de dégradation des AHL	26
Figure 8: AHL réduite par les oxydoréductases en substituant l'oxo-groupe aux positions C3 ou ω -1, ω -2 et ω -3 avec un groupe hydroxyle	26
Figure 9: Structure de SsoPox-W263I (PDB ID : 4KF1).....	31
Figure 10: Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières des différents isolats bactériens	50
Figure 11: Dendrogramme des isolats bactériens (Sans redondance) réalisé avec le logiciel MALDI BioTyper TM 3.0 (Bruker Daltonics).....	51
Figure 12: Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des produits d'amplification par PCR du gène ADNr 16S.	52
Figure 13: Arbre phylogénétique construit avec la méthode Neighbor-joining montrant les liens phylogénétiques entre les séquences basées sur les gènes d'ADNr 16S des isolats bactériens. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les valeurs de Bootstrap pour 1000 réplcats.	54
Figure 14: Résultats de la migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 % des produits d'amplification par PCR du gène <i>rpoB</i>	55
Figure 15: Arbre phylogénétique construit avec la méthode Neighbor-joining montrant les liens phylogénétiques entre les séquences <i>rpoB</i> des isolats bactériens. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les valeurs de Bootstrap (1000 réplcats)	57
Figure 16 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode Neighbor-joining montrant les liens phylogénétiques entre les séquences concaténées des gènes <i>rpoB</i> (534 pb) et <i>gyrB</i> (1244pb) des espèces du genre <i>Aeromonas</i>	58
Figure 17: Plan expérimental adopté pour tester l'effet de la protéine SsoPox W263I sur les trois facteurs de virulences des sept isolats	95
Figure 18 : Gel SDS-PAGE 10 % révélé au bleu de Coomassie montrant la purification de SsoPox W263I en conditions dénaturantes..	97
Figure 19: L'effet de SsoPox sur la croissance de PA01.....	99
Figure 20: Mesure du biofilm par pesage direct des agrégats cellulaires.....	101
Figure 21: Effets de SsoPox sur les facteurs de virulence des sept isolats	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Enzymes de dégradation des AHL	29
Tableau 2: Amorces utilisées pour le séquençage d'ADNr 16S	39
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard et le BigDye® de <i>rpoB</i>	41
Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard et le BigDye® de la <i>GyrB</i>	42
Tableau 5: Caractéristiques des amorces utilisées pour la PCR standard et le BigDye de la <i>GAPDH</i> . 43	
Tableau 6: Résultats de la coloration de Gram et des tests phénotypiques respiratoires des isolats bactériens.....	48
Tableau 7: Scores d'identification par MALDI-TOF MS	49
Tableau 8: Codes EMBL des séquences d'ADNr 16S pour les 14 isolats et leurs noms systématiques	53
Tableau 9: Codes EMBL des séquences du gène <i>rpoB</i>	56
Tableau 10: Structures 2D des <i>ADNr 16S</i> et <i>rpoB</i> séquencés des différents isolats et leurs énergies libres ΔG°	59
Tableau 11 : Résultats des séquences protéiques de la <i>GAPDH</i> contre BlastP.....	64
Tableau 12: Structures secondaires de <i>GAPDH</i> prédites avec le programme bioinformatique GOR IV	67
Tableau 13: Diagrammes de Ramachandran de la <i>GAPDH</i> des différents isolats générés par Geno3D	74
Tableau 14: Modèles 3D prédits <i>in silico</i> pour les différentes séquences de <i>GAPDH</i> générés par le programme Modeller.....	77
Tableau 15 : Scores et spectres des différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> testées	98
Tableau 16: L'effet de <i>SsoPox</i> sur l'activité protéolytique des 7 isolats.....	100
Tableau 17 : Résultats de l'effet de <i>SsoPox</i> sur la production de la pyocyanine des 7 isolats	100
Tableau 18 : Résultats de l'effet de <i>SsoPox</i> sur la production du biofilm des 7 isolats	101
Organigramme : Démarche pour l'isolement et l'identification des germes rencontrés dans l'étude	
Diagramme : Etapes pour la prédiction des structures 3D	

SOMMAIRE

LISTE DES ACRONYMES	i
LISTE DES TABLEAUX.....	iii
LISTE DES FIGURES, ORGANIGRAMMES ET DIAGRAMMES.....	iii
INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.LES MAMMITES BOVINES : DEFINITION, ETIOLOGIE, METHODES DE DIAGNOSTICS	3
1.1. Mammite bovine.....	3
1.2. Etiologie des mammites.....	3
1.3. Physiopathologie	4
1.4. Incidence des mammites bovines	5
1.5. Diagnostic des mammites subcliniques	6
1.6. Identification moléculaire des bactéries	7
1.6.1. Identification par séquençage du gène ADNr 16S	8
1.6.2. Identification par séquençage des gènes de ménage	9
1.7. Identification protéomique par MALDI-TOF MS.....	10
1.7.1. Historique	10
1.7.2. Principe.....	11
2.POUVOIR PATHOGENE DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ET QUORUM QUENCHING ..	14
2.1. Pouvoir pathogène	14
2.2. Caractéristiques et génome de <i>P. aeruginosa</i>	14
2.3. Le <i>quorum</i> sensing (QS).....	15
2.3.1. Le QS chez <i>P. aeruginosa</i>	16
2.3.2. La synthèse des autoinducteurs chez <i>P. aeruginosa</i>	19
2.4. Facteurs régulés par le QS	19
2.4.1. Facteurs de virulence associés à la bactérie	20
2.4.2. Facteurs de virulence sécrétés.....	22
2.5. Inhibition de la virulence bactérienne par dégradation enzymatique des signaux QS ..	24
2.5.1. Types d'enzymes dégradant les AHL	25
2.5.2. Enzyme <i>SsoPox</i>	30
PARTIE EXPERIMENTALE	
Chapitre 1 : Identification rapide des bactéries responsables des mammites subcliniques	
1.INTRODUCTION.....	32

2.MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	32
2.1. Description des échantillons animaux	32
2.2. Le CMT et prélèvement des échantillons de laits et leur conservation.....	33
2.2.1. Réalisation du CMT	33
2.2.2. Conservation des prélèvements.....	33
2.3. Isolement et tests phénotypiques (Organigramme)	34
2.4. Identification par MALDI-TOF MS.....	36
2.4.1. Préparation de la matrice et dépôt de l'échantillon	36
2.4.2. Lancement du MALDI-TOF MS et interrogation de la base de données.....	36
2.5. Identification génotypique des isolats	37
2.5.1. Identification par séquençage de l'ADNr 16S	37
2.5.2. Identification moléculaire par séquençage du gène <i>rpoB</i>	41
2.5.3. Identification moléculaire par séquençage du gène <i>GyrB</i>	42
2.5.4. Identification moléculaire par séquençage du gène <i>gap</i>	42
2.6. Analyses bioinformatiques	43
2.6.1. Prédiction de la structure secondaire des gènes ADNr 16S et <i>rpoB</i>	44
2.6.2. Prédiction des structures 2D de la GAPDH à partir des séquences	45
2.6.3. Prédiction des structures 3D de la GAPDH à partir des séquences	46
3.RÉSULTATS	48
3.1. Caractérisation phénotypique des isolats bactériens	48
3.2. Identification par MADI-TOF MS	48
3.3. Identification génotypique.....	51
3.3.1. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S.....	51
3.3.2. Amplification et séquençage du gène <i>rpoB</i>	55
3.3.3. Utilisation de la méthode MLST pour l'identification de l'isolat C13	57
2.4. Analyses bioinformatiques	58
4.DISCUSSION	81
Chapitre II : Atténuation de la virulence de <i>P. aeruginosa</i> par <i>Quorum</i> quenching	
1.INTRODUCTION.....	91
2.MATÉRIEL ET MÉTHODES	91
2.1. Production de la protéine <i>SsoPox</i> W263I.....	91
2.2. Purification de la protéine <i>SsoPox</i> W263I.....	92
2.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	92
2.2.2. Purification en utilisant l'automate ÄKTA	93

2.2.2.2. Chromatographie par exclusion de taille	93
2.3. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	93
2.4. Mesure de l'activité de <i>SsoPox</i>	94
2.5. Bactéries et conditions de culture	94
2.6. Effet de <i>SsoPox</i> sur la croissance de PA01	95
2.7. Mesure des facteurs de virulence.....	96
2.7.1. Mesure de l'activité protéolytique.....	96
2.7.2. Mesure de la production de la pyocyanine	96
2.7.3. Mesure du poids du biofilm	96
3.RÉSULTATS	97
3.1. Purification de <i>SsoPox</i> W263I.....	97
3.2. Mesure de l'activité phosphotriestérase	97
3.3. Confirmation des sept <i>P. aeruginosa</i> par MALDI-TOF MS.....	97
3.4. Effet de <i>SsoPox</i> sur la croissance de PA01	99
3.5. Effet sur les facteurs de virulences	99
3.5.1. L'activité protéolytique	99
3.5.2. Effet sur la sécrétion de la pyocyanine	100
3.5.3. Effet sur la production du biofilm	100
4.DISCUSSION	103
Conclusion générale et perspectives	107
Références bibliographiques	109
Annexes.....	143
Résumés	159

Introduction

L'élevage bovin joue un rôle économique et social important au sein de la société algérienne. Considérés comme une source de protéine animale importante et ayant un rôle vital dans l'alimentation humaine, les produits de l'élevage bovin constituent une source de rentabilité appréciable pour les agriculteurs. En effet, ce secteur revêt un caractère stratégique en égard à son impact sur la sécurité alimentaire et sa place socio-économique. Outre cette importance, ce secteur favorise le maintien des éleveurs sur leurs exploitations en leur assurant un revenu régulier (Bensaha et Arbouch, 2016). Malgré le développement de cet élevage qui est passé de 1 560 545 de bovins en 2003 à 1 909 455 en 2013 (Agroligne, 2014) avec environ 1 604 425 de bovins en 2011 (MADR, 2011), l'approvisionnement en protéines animales en Algérie reste toujours insuffisant. Cette faible production est liée à plusieurs contraintes notamment les infections bactériennes. Pour réduire l'impact de ces maladies, il est fondamental de bien les connaître pour les contrôler.

Vu l'importance des atteintes infectieuses causant toutes ces pertes économiques, nous avons tracé les objectifs suivants durant la réalisation de notre thèse :

- Mettre en évidence l'importance d'identifier les bactéries pathogènes responsables de la mammite subclinique par une méthode protéomique : la MALDI-TOF MS et montrer l'importance des outils bioinformatiques dans l'identification bactérienne (Analyses des structures secondaires et tertiaires).
- Estimer l'inhibition de la virulence bactérienne par l'interférence au *quorum* sensing des *Pseudomonas aeruginosa* responsables des infections respiratoires chez les veaux.

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à une maladie d'une grande importance chez les bovins : la mammite subclinique. Une maladie asymptomatique très fréquente chez les vaches laitières. Afin de mieux caractériser et traiter cette maladie, il est nécessaire d'identifier les bactéries causant cette infection.

L'identification classique des bactéries du lait de vache repose généralement sur des méthodes phénotypiques. Ces dernières sont basées sur une culture bactérienne et une période d'incubation allant de 24 h à 72 h. De ce fait, ces méthodes phénotypiques sont lentes et ne parviennent pas toujours à identifier certaines bactéries. Néanmoins, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS s'est développée dans les laboratoires de microbiologie clinique et permet de réaliser rapidement et à moindre coût un diagnostic d'espèce sur des colonies de bactéries ou des champignons isolés sur des milieux de culture solides.

Le MALDI-TOF MS est actuellement employé comme outil de première ligne dans de nombreux hôpitaux pour identifier les bactéries, mais il existe peu de description sur son utilisation dans les diagnostics vétérinaires (Randall *et al.*, 2015).

Nous réaliserons une identification des bactéries causatrices des mammites subcliniques isolées des vaches laitières dans deux régions de l'est algérien : Constantine et Batna, par MALDI-TOF MS en utilisant, en tant que référence, l'identification moléculaire par séquençage de l'*ADNr 16S* et le gène de ménage *rpoB*.

Dans la deuxième partie, nous testerons l'effet inhibiteur d'une protéine sur la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* infectant des veaux pneumoniques. Ce dernier provoque différentes infections comme les mammites, les endométrites, les abcès ou les infections respiratoires (Park *et al.*, 2013; Hossain *et al.*, 2013; Ghanem *et al.*, 2015; Oucheryah, 2015). La forte prévalence de la multi-résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* et l'absence de perspectives de développement de nouveaux antibiotiques nécessitent une exploration d'autres voies thérapeutiques. Parmi celles-ci, le QS, qui est un mécanisme de communication entre les bactéries. Il a été proposé comme cible, car plusieurs facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sont contrôlés par ce système.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de deux chapitres successifs précédés d'une étude bibliographique qui a porté sur la description des mammites, leurs étiologies et les moyens de diagnostic puis, sur le pathogène *P. aeruginosa*, son QS et les méthodes QQ. Enfin, dans la conclusion générale, nous tenterons de mettre en exergue les points importants apportés par notre travail, ainsi que nos futures perspectives.

Synthèse Bibliographique

1. LES MAMMITES BOVINES : DEFINITION, ETIOLOGIE, METHODES DE DIAGNOSTICS

1.1. Mammite bovine

Une mammite désigne, une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle due généralement à une infection bactérienne (Seegers, Ménard et Fourichon, 1997). Des mammites "aseptiques" peuvent être dues à des désordres physiologiques ou à des traumatismes locaux mais elles restent beaucoup plus rares. Les infections mammaires peuvent ou non être associées à des signes cliniques. On distingue les mammites cliniques et les mammites subcliniques.

Les mammites cliniques sont caractérisées par la présence des signes cliniques fonctionnels et locaux, voire généraux. Les signes cliniques fonctionnels se traduisent par des modifications macroscopiquement visibles de la quantité et de la qualité de l'aspect du lait. Les signes locaux sont observés lors d'un processus inflammatoire au niveau de la mamelle à savoir : douleur, chaleur, œdème, rougeur du quartier atteint. Enfin, les signes cliniques généraux se traduisent par une hyperthermie, abattement et anorexie (Gedilaghine, 2005).

Les mammites subcliniques ne s'accompagnent d'aucun symptôme (Général, local, ou fonctionnel). La détermination du nombre de cellules somatiques dans le lait peut servir à reconnaître les cas de mammites subcliniques (Erskine, 2011). Il y a 20 à 40 cas de mammites subcliniques pour chaque cas de mammite clinique (Benhamed, 2014).

1.2. Etiologie des mammites

La grande majorité des mammites sont d'origine infectieuse. Elles sont provoquées par plus d'une centaine de microorganismes. La plupart des infections sont d'origine bactérienne et beaucoup plus rarement causées par des levures. Généralement une seule espèce bactérienne est en cause, plus rarement l'association de deux espèces est possible. On considère d'ailleurs que la présence de plus de deux germes dans un lait de mammite est un signe d'une contamination du prélèvement (Noireterre, 2006).

Les espèces bactériennes responsables de mammites appartiennent à deux groupes :

- 1) Les espèces pathogènes majeures et potentiellement responsables de mammites cliniques :
 - i. Les streptocoques (*Streptococcus uberis*, *S.dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, *S. agalactiae*),

- ii. Les entérocoques (*Enterococcus faecalis*...),
- iii. Les staphylocoques à coagulase positive (SCN) (*Staphylococcus aureus subsp. aureus*),
- iv. Les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*...).

Ces germes sont responsables de la majorité des mammites cliniques, à hauteur de 80-90%.

- 2) Les espèces pathogènes mineures sont exceptionnellement responsables de mammites cliniques, mais plutôt de mammites subcliniques. Ce sont essentiellement les staphylocoques à coagulase négative (*S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* (Noireterre, 2006).

Des virus peuvent aussi être impliqués dans le déclenchement des mammites, soit en causant des lésions du trayon favorisant ainsi la contamination par d'autres pathogènes, soit en ayant une action immunosuppressive (Wellenberg *et al.* 2002; Barkema *et al.*, 2009).

1.3. Physiopathologie

La pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle se fait principalement par le canal du trayon (Fig.1) à l'exception des quelques bactéries pouvant pénétrer par voie hématogène (les mycoplasmes, les salmonelles, *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium paratuberculosis*) (Rémy, 2010). Ils peuvent être évacués par l'éjection du lait. Certaines bactéries ont la capacité d'adhérer à l'épithélium, de pénétrer dans les cellules et de s'y multiplier. Puis elles se déplacent du trayon vers les alvéoles de la citerne mammaire où le lait est synthétisé (Rinaldi *et al.*, 2010). La prolifération des germes s'accompagne de la production d'enzymes et de toxines qui vont léser le tissu sécrétoire et provoquer une modification qualitative du lait produit. Les toxines bactériennes relarguées dans la mamelle associées au passage des polynucléaires neutrophiles du sang vers la mamelle engendrent une perméabilité accrue de l'épithélium favorisant la pénétration des bactéries vers le parenchyme mammaire, voire même la circulation sanguine (Angoujard, 2015).

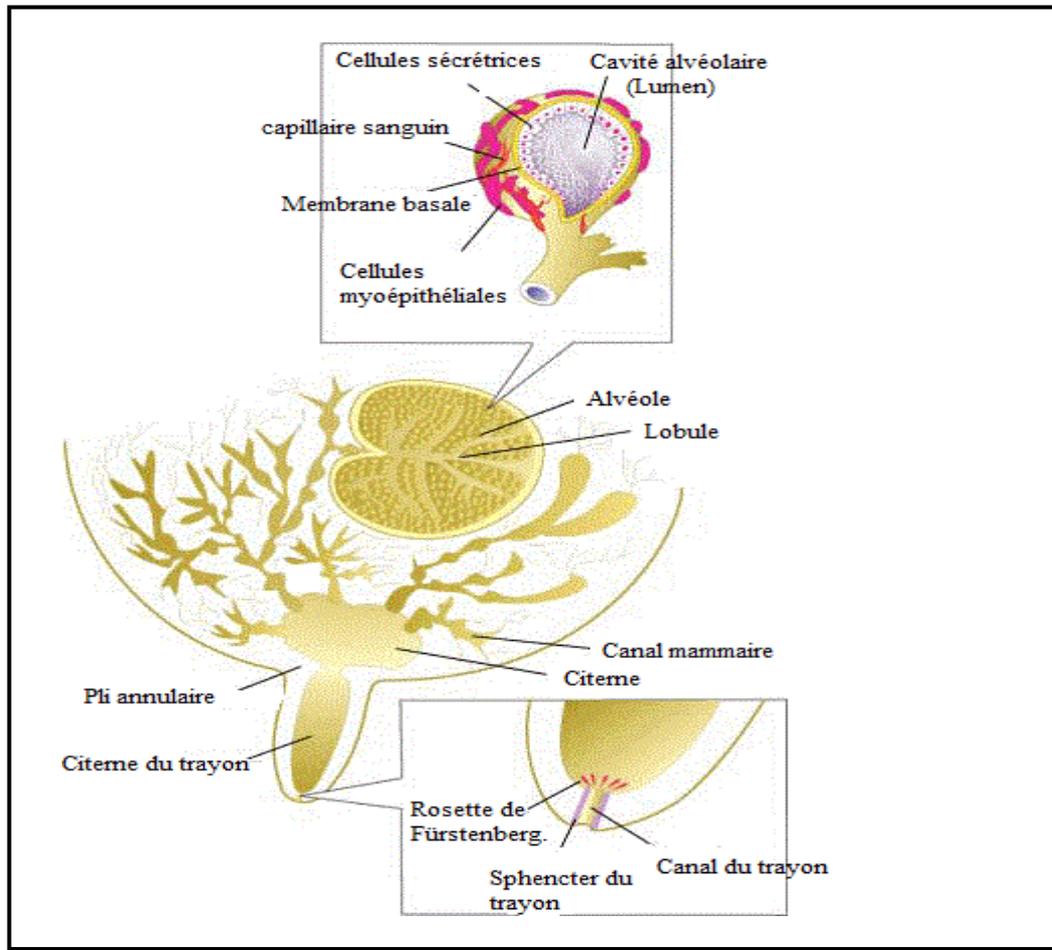


Figure 1: Schéma de l'anatomie de la glande mammaire¹

1.4. Incidence des mammites bovines

Les mammites bovines ont un impact médical, étant donné que les mammites suraigües sont responsables de la perte du quartier atteint voire même de l'animal. Les mammites subcliniques, difficilement curables, causent la perte de l'animal ou du moins son abattage précoce. Les mammites aiguës et suraigües altérant l'état général de l'animal, peuvent intervenir comme facteurs prédisposant à d'autres maladies de la vache laitière, comme les arthrites ou des endocardites secondaires au passage du germe dans la voie sanguine (Barrot Debreil, 2008).

Sur le plan sanitaire, le lait de mammitique clinique n'est pas commercialisé mais celui des infections subcliniques peut entrer dans la production de fromage, lait et autres produits laitiers (Barrot Debreil, 2008). En l'absence de pasteurisation, des germes pathogènes pour l'homme provenant des quartiers infectés peuvent contaminer les produits laitiers et être

¹ <http://www.delaval.ch/fr-nl/-/Savoir-laitier/Traite/La-glande-mammaire/>

responsable de toxi-infections alimentaires (Benhamed, 2014). Certains sont très étudiés : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, ou *Salmonella*. D'autres le sont moins comme *Escherichia coli*.

Les mammites bovines constituent un domaine pathologique dans les élevages laitiers où elles occasionnent des pertes économiques (Seegers, Ménard, et Fourichon, 1997). Ceci tient principalement du fait de leur fréquence, des frais vétérinaires qu'elles entraînent (honoraires, coût des traitements) et de leurs répercussions néfastes tant qualitatives que quantitatives sur la production laitière. En effet, celle-ci s'en trouve réduite tandis que l'altération de la composition du lait qui en résulte (Baisse du lactose, des caséines, de certains minéraux tels que le calcium et le phosphore, augmentation des protéines solubles inutilisables pour la fabrication de fromages) se répercute sur les aptitudes technologiques du lait. L'impact économique est ainsi formé par la somme des coûts des actions de maîtrise (traitements et préventions) et des pertes (Réductions de production, lait non commercialisé, pénalités sur le prix de vente, mortalités et réformes anticipées) (Gedilaghine, 2005).

1.5. Diagnostic des mammites subcliniques

Le diagnostic des mammites subcliniques qui ne peuvent pas être détectées par la clinique puisqu'elles n'entraînent des modifications ni du lait ni de la mamelle, repose sur la numération des cellules somatiques du lait, la mise en évidence des modifications chimiques et la recherche de la bactérie en cause. Ces méthodes ne permettent qu'une prédiction de l'infection, sans identification de l'agent pathogène, mais elles ont souvent l'avantage d'être mises en œuvre plus facilement. L'augmentation des cellules somatiques peut être révélée par différentes méthodes

- i. Les cellules somatiques sont souvent mesurées par une méthode directe automatique basée sur le comptage des noyaux cellulaires dont l'ADN est rendu phosphorescent (Appareil Fossomatic, société Foss Electric).
- ii. Le California mastitis test (CMT) est basé sur l'emploi d'un détergent tensioactif (solution de Teepol à 10 %) sur le lait. Le détergent provoque la lyse des cellules du lait par la destruction de leur paroi. L'ADN est libéré, il forme un réseau de très longs filaments. Ce réseau augmente la viscosité du lait jusqu'à flocculer. Plus la concentration cellulaire est élevée, plus la quantité d'ADN libéré est élevée et plus le flocculat sera important (Angoujard, 2015).
- iii. La conductivité électrique du lait (Fernando *et al.*, 1982). Elle permet de mesurer les changements de concentration ionique du lait lors d'une

inflammation. Son principe est basé sur la mise en évidence de l'augmentation de la conductibilité électrique du lait mammitique dont la teneur est élevée en ions sodium et chlore au détriment du lactose et du potassium.

L'examen bactériologique est une arme précieuse dans la stratégie de lutte contre les mammites bovines, mais, pour des raisons de coût, de délais et de difficulté liées aussi bien au prélèvement de l'échantillon qu'à son exploitation, cet examen doit être mis en œuvre dans des conditions précises. En effet, l'analyse bactériologique d'un échantillon de lait provenant d'une vache atteinte de mammitite passe par plusieurs étapes successives (Bouchot *et al.*, 1985) : la réalisation du prélèvement, sa conservation et son transport, l'ensemencement, l'identification des germes isolés et l'antibiogramme.

L'examen bactériologique permet un diagnostic de certitude de l'infection mammaire. Il consiste en la mise en culture du lait afin de déterminer la nature du germe responsable de l'infection. Le praticien peut prescrire cet examen en réalisant un prélèvement de lait et en adressant rapidement, sous régime de froid, aux laboratoires. On obtient un résultat entre 5 et 8 jours, ce qui permet sur plusieurs prélèvements, d'orienter sur la nature du germe, les mesures médicales et prophylactiques à mettre en œuvre (Barrot Debreil, 2008).

1.6. Identification moléculaire des bactéries

Les techniques de biologie moléculaire ont bouleversé l'identification des bactéries, et ont mis en lumière les insuffisances et les erreurs d'identifications phénotypiques qui étaient jusque là seules disponibles.

L'identification des bactéries, isolées à partir de prélèvements biologiques, a été uniquement basée sur des critères morphologiques et biochimiques. Le développement des techniques de biologie moléculaire à partir des années 1990 a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique. Elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures voire moins dans les situations d'urgence (Identification et typage du germe, et détection des résistances antibiotiques) ou d'identifier un micro-organisme si les systèmes utilisés en routine (Approche biochimique) sont pris en défaut. De plus, dans des prélèvements biologiques, elles rendent possible la caractérisation des bactéries si la culture est restée négative, si les bactéries recherchées sont des bactéries intracellulaires strictes (pour lesquelles la culture est réservée à des laboratoires spécialisés) ou des bactéries encore incultivables à ce jour.

Le gène ciblé est fonction des informations disponibles sur l'isolat bactérien et/ou sur le patient. Le gène amplifié est comparé à des bases de données internationales (BLAST) permettant l'identification de la bactérie aux rangs du genre ou de l'espèce en fonction du pourcentage de similarité de celui-ci avec la souche homologue de la base de données.

1.6.1. Identification par séquençage du gène ADNr 16S

L'identification moléculaire des bactéries repose essentiellement sur l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S spécifique des bactéries. Celui-ci est le constituant de la petite sous unité ribosomale du 30S des procaryotes. Le gène codant pour cet ARNr est l'*ADNr 16S* (Clarridge et Alerts 2004), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Woese 1987; Reller, Weinstein, et Petti 2007). Il est composé d'environ 1500 nucléotides et est constitué de sept régions conservées et de neuf régions hypervariables (Chakravorty *et al.*, 2007).

Ce gène a d'abord été utilisé à la fin des années 1980 par Carl Woese comme outil d'étude de l'évolution bactérienne (Woese, 1987). En 1991, Weisburg *et al.* ont décrit des amorces dites "universelles" permettant d'amplifier l'intégralité du gène codant pour l'ARNr 16S de la plupart des bactéries. Actuellement de multiples amorces universelles sont décrites dans la littérature.

Il convient de séquencer au moins 500 à 525 bp, idéalement 1300 à 1500 bp. Les termes de "16S court" et "16S long" feront leur apparition dans le langage courant des microbiologistes pour faire référence à différentes longueurs de séquences amplifiées (Renvoisé, 2012). Le "16S court" fait référence à l'amplification d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16S, le plus souvent les 500 premiers nucléotides mais ce n'est pas toujours le cas (Reller *et al.*, 2007). Pour la plupart des souches, le pouvoir discriminant de ces courtes séquences semble suffisant pour discriminer les espèces entre elles (Clarridge et Alerts, 2004). Pour différencier certains genres ou pour décrire une nouvelle espèce, l'amplification "16S long" reste une étape nécessaire (Clarridge et Alerts, 2004).

La séquence obtenue au laboratoire est comparée via le réseau Internet, à l'aide de logiciel spécialisé de GenBank maintenant appelée (Nucleotide)² ou de EMBL Europe³. L'identification bactérienne va reposer sur le pourcentage de similarité des séquences. Une

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

³<http://www.ebi.ac.uk/>

bonne identification est consécutive d'un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 97 % entre la souche à identifier et celle de la GenBank (Janda et Abbott, 2007).

1.6.2. Identification par séquençage des gènes de ménage

Les gènes domestiques, ou gènes de ménage (Housekeeping genes), codent principalement pour des protéines essentielles aux fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Ils existent en un seul exemplaire chez pratiquement tous les microorganismes et présentent une grande diversité intra-spécifique (Rong et Huang, 2014).

1.6.2.1. Identification par séquençage du gène *gap*

Le gène *gap* code pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase GAPDH (EC 1.2.1.12). La GAPDH est l'une des enzymes clé de la glycolyse. Elle catalyse la phosphorylation oxydative du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3- bisphosphoglycérate. Elle existe chez toutes les espèces étudiées et sa séquence est très bien conservée (Figge *et al.*, 1999). La participation à la glycolyse est la fonction principale de la GAPDH phosphorylante, mais d'autres rôles ont été postulés pour cette enzyme (Sirover, 1996). Ainsi, chez certains streptocoques, des formes de GAPDH ancrées dans la membrane externe semblent exister et être impliquées dans la pathogénicité des cellules (Pancholi et Fischetti, 1992).

La GAPDH est un homotétramère dont les sous-unités ont une masse moléculaire variant de 34 à 38 kDa selon les espèces. Une sous-unité est composée d'environ 330 acides aminés qui se replient en formant deux domaines. Le premier domaine de chaque sous-unité fixera une molécule NAD^+ . Le second domaine de chacune des deux sous-unités sera impliqué dans la fixation du substrat et à la catalyse, essentiellement gouvernée par l'implication de deux acides aminés majeurs qui sont l'histidine et la cystéine.

1.6.2.2. Identification par séquençage du gène *rpoB*

L'identification moléculaire de certaines bactéries peut être réalisée grâce à l'analyse de la séquence du gène *rpoB* de la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN-dépendante. L'analyse de cette séquence vient en complément de l'analyse de la séquence du gène *ARNr 16S* pour un certain nombre de groupes et de genres bactériens, pour lesquelles le gène *ARNr 16S* est peu discriminant (Küpfer *et al.* 2006; Arnold *et al.* 2012).

1.6.2.3. Identification par séquençage du gène *gyrB*

Le gène *gyrB* code la sous unité β de l'ADN gyrase, qui est une protéine spécifique des bactéries, principalement responsable du surenroulement négatif de l'ADN, essentielle à

la réplication de leur chromosome circulaire. *Ce gène peut être une cible alternative efficace ou complémentaire pour l'identification et l'analyse taxonomique de certaines bactéries* (Wang *et al.*, 2007).

1.7. Identification protéomique par MALDI-TOF MS

1.7.1. Historique

Les premiers spectromètres de masse datent du début du 20^{ème} siècle et ont servi en physique à rechercher les différents isotopes d'un élément chimique. Elle est issue de la découverte par Euge Goldstein (1886), les rayons canaux dus aux ions positifs et de leur analyse par un champ magnétique, par Wilhelm Wien en 1898.

La spectrométrie de masse prend de plus en plus d'ampleur et de nombreuses nouvelles techniques d'ionisation et de séparation des ions ont été mises en place. Le développement de la méthode MALDI-TOF se fait dans les années 80. À cette période, l'ionisation se faisait sur des molécules ayant une taille d'environ 1000 Daltons et il était impensable d'ioniser des molécules excédant 10000 Daltons car trop fragiles. En 1985, Koichi Tanaka (Prix Nobel en 2002) constate que des macromolécules peuvent être séparées en mélangeant l'échantillon avec une solution contenant de la poudre métallique ultrafine et du glycérol. Pour l'identification des micro-organismes, Cain *et al.* (1994) sont les premiers à avoir utilisé le MALDI-TOF. L'analyse MALDI portait sur des extraits protéiques obtenus par sonication des bactéries. Par la suite, Holland *et al.* (1996) ont réalisé les premières analyses par MALDI-TOF MS à partir de bactéries intactes. Après une croissance de 18 h sur un milieu solide, les bactéries sans aucun traitement préalable, étaient directement mélangées à la matrice avant d'être ionisées et analysées. La présence de quelques ions caractéristiques du spectre a suffi pour obtenir l'identification d'une espèce.

Depuis la fin des années 1990, de nombreuses études ont confirmé l'intérêt de cette technique (Fenselau et Demirev, 2001; Lay, 2001). On peut citer l'identification, en 1996, d'agents *Bacillus anthracis*, *Brucella melitensis*, *Yersinia pestis* et *Francisella tularensis* (Krishnamurthy *et al.*, 1996). La même année, Claydon *et al.* (1996) ont décrit l'identification bactérienne par MALDI-TOF de 10 micro-organismes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, *Mycobacterium smegmatis*. En 2002, Bright *et al.* ont analysé 212 isolats appartenant à la famille des entérobactéries montrant une bonne identification d'espèce et de genre dans 84 % et 89 % des cas respectivement. D'autres études ont été décrites,

portant sur des groupes bactériens particuliers tels les streptocoques β -hémolytiques (Kumar *et al.*, 2004).

Depuis ces travaux, l'ensemble des publications concernant l'identification des bactéries, permet d'affirmer que les empreintes spectrales des principales espèces cultivables identifiées en routine ont été obtenues (Suarez, 2013). En 2009, Seng *et al.* ont identifié 1660 isolats par cette technique. Les 83,8 % de ces bactéries ont été bien identifiées jusqu'à l'espèce et 95 % jusqu'au genre.

1.7.2. Principe

Le MALDI-TOF MS est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur temps de vol (Time of flight) qui proportionnel à leur masse et à leur charge. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation (le laser) suivie d'un analyseur qui sépare les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions libérés, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal et le comparer à celui de la database.

L'échantillon est mélangé à la matrice sur un support qui est la plaque cible. L'évaporation des solvants conduit à la cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes (Fig.2).

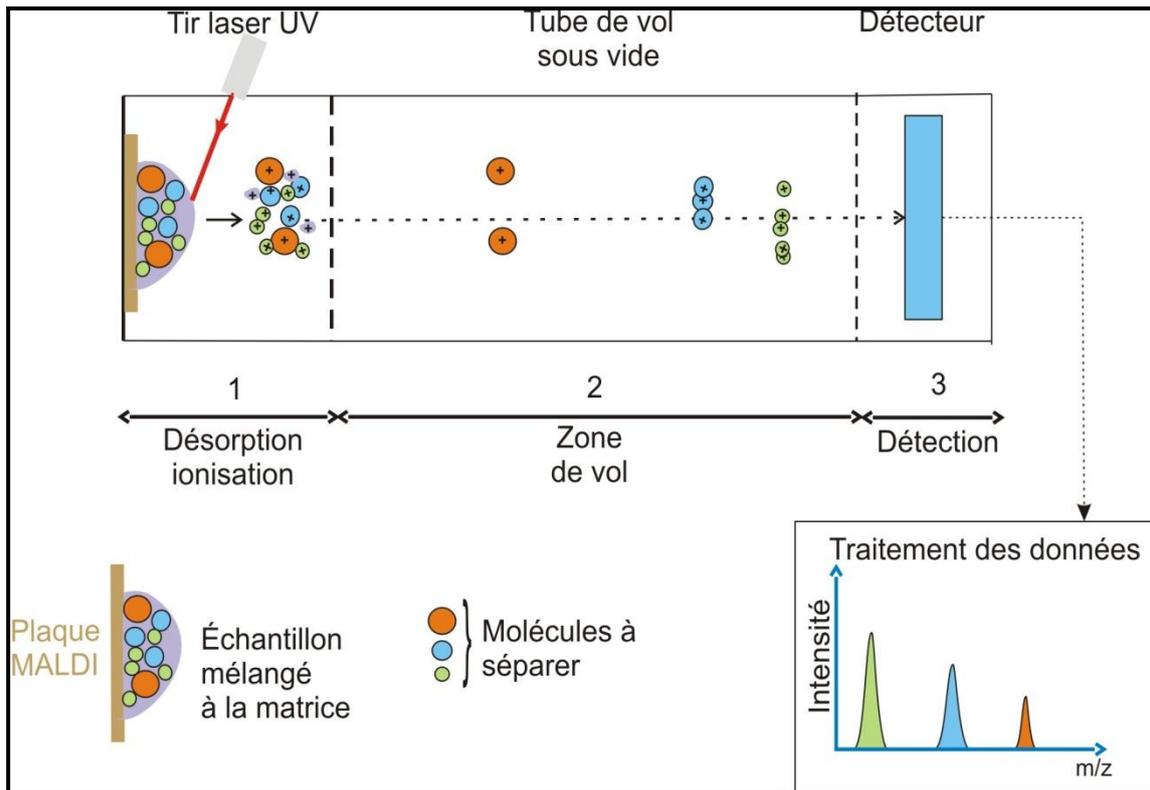


Figure 2: Fonctionnement de la technique MALDI-TOF MS⁴

Les composés ionisés issus des protéines bactériennes généralement de charge +1 vont être accélérés par un champ électrique, et l'analyseur va les séparer en fonction de leur rapport m/z . Ils traversent ensuite le « tube de vol » à l'extrémité duquel se trouve le détecteur. Les ions sont séparés selon leur temps de vol, ceux de petite taille atteignant le détecteur en premier. Le temps de vol pour atteindre le détecteur est utilisé pour calculer la masse de chaque particule. La somme des ions analysés va former un spectre caractéristique de l'échantillon.

Classiquement, l'axe des abscisses correspond au rapport masse sur charge (m/z) et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal. Les premières applications de cette approche à l'identification de bactéries intactes remontent au milieu des années 1990. Depuis les premiers travaux, les empreintes spectrales des principales espèces cultivables de bactéries, levures et champignons ont été obtenues.

L'obtention d'un spectre caractéristique ou « signature spectrale » ou encore « empreinte spectrale » d'une espèce bactérienne donnée est à la base de l'utilisation de la SM dans l'identification bactérienne. En quelques années, la SM appliquée à la microbiologie

⁴ <http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/ressources/microbiologie/identification-de-micro-organismes-par-spectrometrie-de-masse-maldi-tof-ms>

s'est développée et améliorée dans le but d'obtenir des spectres de masses reproductibles, permettant d'identifier les bactéries au niveau de la famille, du genre, de l'espèce, et parfois de la sous-espèce.

Dans son application en microbiologie, la technique du MALDI-TOF repose sur la détection de peptides ; Il s'agit essentiellement de protéines cytosoliques basiques, en quantité abondante, hydrophiles, dont les principales identifiées sont les protéines ribosomales ou les « *cold shock proteins* » (Carbonnelle et Nassif, 2011).

2. POUVOIR PATHOGENE DE *Pseudomonas aeruginosa* ET QUORUM QUENCHING

2.1. Pouvoir pathogène

P. aeruginosa, un bacille à gram négatif, est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes : hommes, animaux, plantes (D'argenio *et al.*, 2001; Pukatzki, Kessin, et Mekalanos, 2002).

Chez l'homme, *P. aeruginosa* est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Parmi les affections les plus courantes : les pneumonies, les infections du tractus urinaire, des brûlures, des plaies ou bien encore les septicémies. De plus, il est directement responsable du taux de mortalité élevé et précoce chez les patients atteints de mucoviscidose (Filloux et Vallet, 2003).

Chez les bovins, *Pseudomonas aeruginosa* peut infecter des vaches affaiblies provoquant une infection très grave dans les glandes mammaires (Bannerman *et al.* 2005; Cervinkova *et al.* 2013; Park *et al.*, 2013). Il est parmi les bactéries les plus susceptibles d'être associées à l'endométrite bovine (Parez, 1985; Ghanem *et al.*, 2015), Hossain *et al.* (2013) ont isolé ce pathogène des Abscess de bovins. Il peut générer des infections respiratoires chroniques qui font partie des maladies les plus coûteuses pour l'industrie bovine (Seker, Kuyucuolu et Selahattin , 2009; Oucheryah, 2015).

2.2. Caractéristiques et génome de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, connue depuis longtemps sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie non sporulante, mobile, opportuniste, vivant à l'état naturel dans l'eau, les sols humides et sur les végétaux. Dans son habitat naturel, *P. aeruginosa* peut être trouvé sous forme planctonique, mobile ou en biofilm, attaché à une surface inerte ou un substrat, ainsi qu'aux tissus vivants (Khalilzadeh, 2009). Sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37 °C. Cette bactérie présente un métabolisme aérobie, mais peut utiliser les nitrates comme accepteurs d'électrons en conditions anaérobies (Vasil, 1986).

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000 à l'université de Washington, Genome Center, Seattle, il s'agit du plus grand génome bactérien connu à ce jour, avec 6264403 (GC=66%) bases codant pour 5570 gènes. La complexité de son génome approche celle de *Saccharomyces cerevisiae* avec ses 6200 gènes. Il contient le plus grand nombre de gène de régulation et un nombre important de gènes impliqués dans le catabolisme, le transport et l'expulsion de composés organiques. Toute cette complexité

refléterait un mécanisme d'évolution adaptatif (Régions codantes=89,4%) nécessaire pour s'installer dans plusieurs niches écologiques. De nombreux gènes sont impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques expliquant le caractère ubiquitaire de cette bactérie et sa capacité à se développer dans des systèmes pauvres en nutriments (Stover *et al.*, 2000; Wolfgang *et al.*, 2003).

2.3. Le *quorum* sensing (QS)

La capacité de *P. aeruginosa* d'envahir un hôte repose sur sa capacité à contrôler un grand nombre de ses facteurs de virulence, par un mécanisme qui contrôle la densité cellulaire et qui permet la communication entre les bactéries. Ce mécanisme est le *Quorum* sensing (QS) (Dockery et Keener, 2001).

Historiquement, le QS a été caractérisé chez *Vibrio fischeri*, une bactérie connue pour sa capacité à produire de la lumière dans certains organes spécifiques du calamar *Euprymna scolopes* (Miyashiro et Ruby, 2012).

Le QS est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production des molécules médiatrices de faible poids moléculaire appelées "autoinducteurs" produites au cours de la croissance bactérienne (Choudhary et Schmidt-Dannert 2010). Ces molécules s'accumulent jusqu'à atteindre une concentration seuil (*Quorum*) reflétant la densité de population bactérienne et permettant d'adopter un comportement de groupe (Boyen *et al.*, 2009). Cette forme de communication cellulaire est utilisée par des microorganismes unicellulaires pour coordonner leurs activités, ce qui leur permet de fonctionner comme des systèmes multicellulaires (Choudhary et Schmidt-Dannert, 2010).

Ces molécules impliquées dans le QS sont capables de moduler l'expression des gènes chez des bactéries de la même espèce mais aussi chez des bactéries appartenant à des espèces différentes (Moghaddam, Khodi et Mirhosseini, 2014) voire même chez des espèces eucaryotes (Sperandio *et al.*, 2003).

De nombreux systèmes de QS impliquant des molécules de structures chimiques différentes ont été identifiés dans le monde bactérien (Eberl et Riedel, 2011) :

- i. le système LuxI/R chez les bactéries à Gram négatif, utilisant généralement des acyl-homosérines lactones (AHL) comme molécule signal.
- ii. le système utilisant des peptides modifiés comme autoinducteurs (AIP) chez les bactéries à Gram positif

- iii. le système utilisant des furanosyl borate diester (AI-2) qui semblent servir de système de communication universel et sont retrouvés chez de très nombreuses bactéries.

2.3.1. Le QS chez *P. aeruginosa*

Les deux premiers systèmes historiques de QS découverts chez *P. aeruginosa* sont *las* et *rhl* (Fig. 3).

Le premier système de *quorum* sensing découvert chez *P. aeruginosa*, est le système *las*, nommé ainsi car la fonction de ce gène a d'abord été évaluée par l'activité enzymatique de l'élastase LasB (Gambello et Iglewski, 1991). Ce système est composé de deux gènes *lasR/lasI*.

Le gène *lasI* code pour une enzyme intervenant dans la synthèse d'une AHL la N-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-AHL) (J P Pearson *et al.*, 1994). Lorsque la concentration de ces molécules atteint un seuil critique, une molécule de 3-oxo-C12-AHL se lie à deux protéines LasR codées par le gène *lasR*. Le complexe C12-LasR agit comme activateur transcriptionnel de nombreux gènes : *lasA*, *lasB*, *aprA*... Cette activation est déclenchée de manière synchrone dans toute la population bactérienne à la jonction entre la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire. La fixation de 3-oxo-C12-AHL sur LasR induit également une activation de *lasI* créant une boucle d'auto-induction (Seed, Passador et Iglewski, 1995).

Le deuxième système de QS, est nommé *rhl* car il a un rôle principal dans la production de rhamnolipides. Il est composé de deux gènes *rhlI/rhlR*. Le gène *RhlI* code pour une enzyme qui permet la production de la C4-AHL (N-butyrylhomosérine lactone) qui est reconnue par deux protéines RhlR codée par le gène *rhlR* (J P Pearson *et al.*, 1995), formant un complexe activateur de la transcription de plusieurs gènes : l'opéron *rhlAB* nécessaire à la production des rhamnolipides, de protéase LasA, élastase B, protéase alcaline et la pyocyanine.

Ces deux systèmes sont autorégulés de sorte que le complexe LasR-C12-AHL est un régulateur positif du gène *LasI* et régule l'expression de gène *rhlR*. Le complexe RhlR-C4-AHL régule la transcription du gène *rhlI* (Moghaddam *et al.*, 2014).

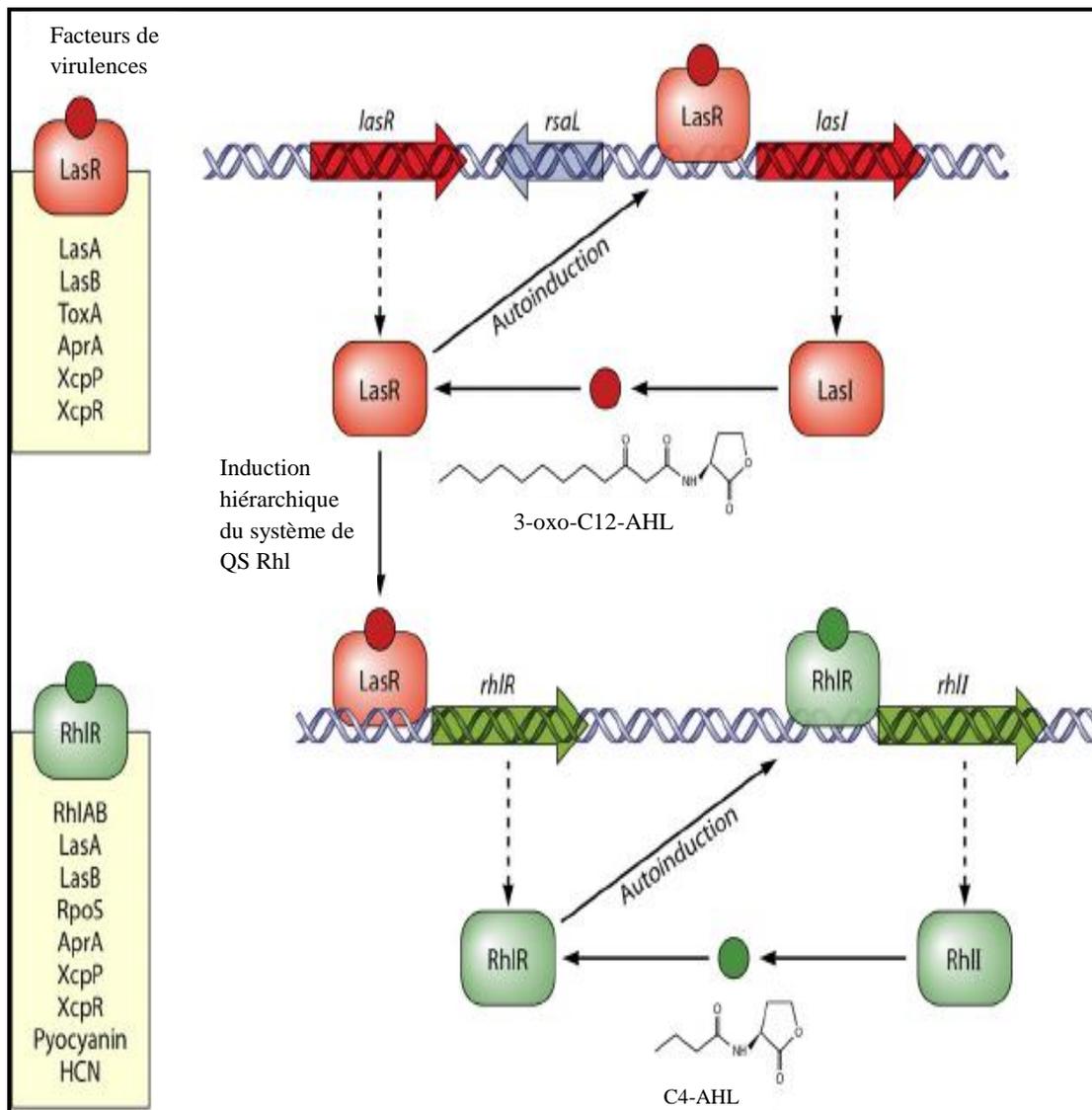


Figure 3 : Régulation de la virulence et interactions entre les deux systèmes de QS *las* et *Rhl* chez *P. aeruginosa* (Jimenez *et al.*, 2012)

(*lasB*: LasB élastase, *lasA*: LasA élastase, *toxA*: exotoxine A, *aprA*: alcaline protéase, *xcpP* et *xcpR*: gènes de système de sécrétion xcp, *rhlAB*: rhamnopolyltransférase et *rpoS*: facteur sigma spécifique de la phase stationnaire)

La C4-AHL diffuse librement à travers la structure pariétale bactérienne, alors que la 3-oxo-C12-AHL fait intervenir un transport actif par pompes d'efflux (Pearson et Delden, 1999).

Les protéines régulatrices LasR et RhIR contiennent deux domaines fonctionnels. La région de liaison à l'homosérine lactone, qui est située dans la partie N-terminale de la protéine et d'un motif hélice-tour-hélice situé dans la partie C-terminale, responsable de la liaison aux promoteurs cibles de la protéine (Bjarnsholt *et al.*, 2010). En effet, les complexes se lient aux

boîtes las-rhl conservées résidant dans les promoteurs des gènes cibles, activant ainsi leur expression transcriptionnelle (Lee et Zhang, 2014).

Un troisième mécanisme de QS à base de quinolones, le *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), a été découvert en 1999 par Pesci et ses collaborateurs (E. C. Pesci et al., 1999). Ce système utilise le 2-heptyl-3-hydroxy-quinolone comme autoinducteur. La transcription des gènes nécessaire à la synthèse du PQS est régulée positivement par LasR et négativement par le système *rhl* (Wade *et al.*, 2005).

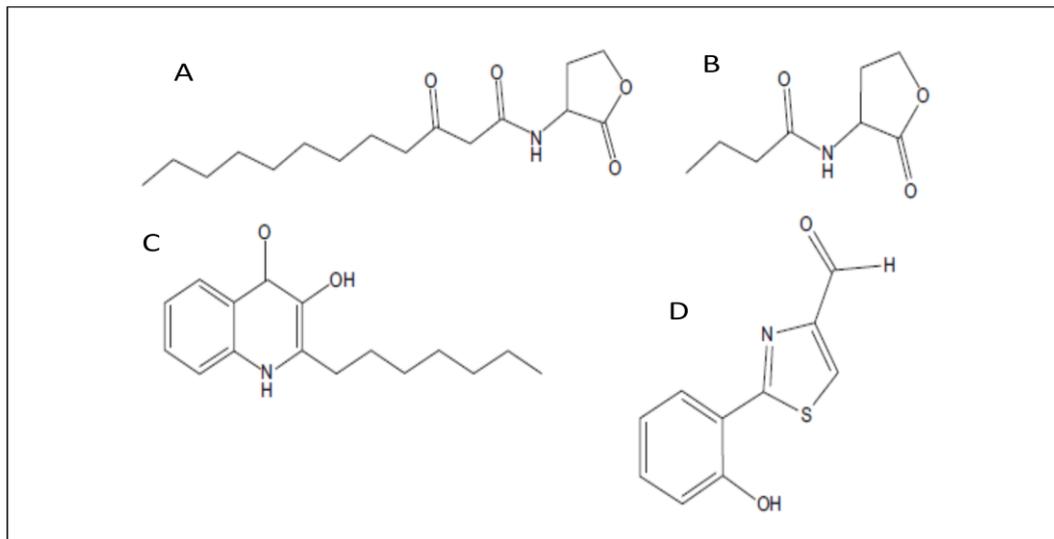


Figure 4 : Structures des signaux QS utilisés par *P. aeruginosa* (Lee et Zhang, 2014)

- A) N-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-AHL)
- B) C4-AHL (N-butyrylhomosérine lactone).
- C) 2-heptyl-3-hydroxy-quinolone (*Pseudomonas* Quinolone Signal PQS).
- D) 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyd (Integrated Quorum sensing Signal IQS).

Récemment un quatrième système de communication inter-cellulaire a été découvert (Lee *et al.*, 2013), nommé IQS. Il appartient à une nouvelle classe de molécules de QS, c'est un 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyd. La perturbation de la biosynthèse de IQS paralyse les systèmes *pqs* et *rhl* et atténue la virulence bactérienne. La production de IQS est étroitement contrôlée par *las* dans les conditions normales de culture, mais, elle est également activée par la limitation du phosphate que les bactéries rencontrent lors d'infections. Les structures de ces signaux QS utilisés par *P. aeruginosa* sont présentées dans la figure 4.

2.3.2. La synthèse des autoinducteurs chez *P. aeruginosa*

Les AHL sont composés d'un noyau lactone à 5 atomes présentant une chaîne aliphatique branchée *via* un atome d'azote sur le carbone adjacent le carbone carbonyle de la fonction lactone. Le premier carbone de la chaîne aliphatique porte toujours une fonction cétone. La diversité de ces molécules (Taille de chaîne, présence d'une fonction alcool ou cétone sur le carbone en position 3 de la chaîne aliphatique) les rend spécifique de l'espèce.

Les AHL sont produites par des enzymes synthases des gènes *lasI* et *rhlI*. Elles catalysent la formation d'une liaison amide entre une chaîne d'acide gras portée par une *acyl carrier protein* (ACP) et la *S-Adenosyl-Méthionine* (SAM) entraînant le départ de 5'-méthylthioadenosine (5'MTA) et la formation de l'AHL (Schaefer *et al.*, 1996) (Fig.5).

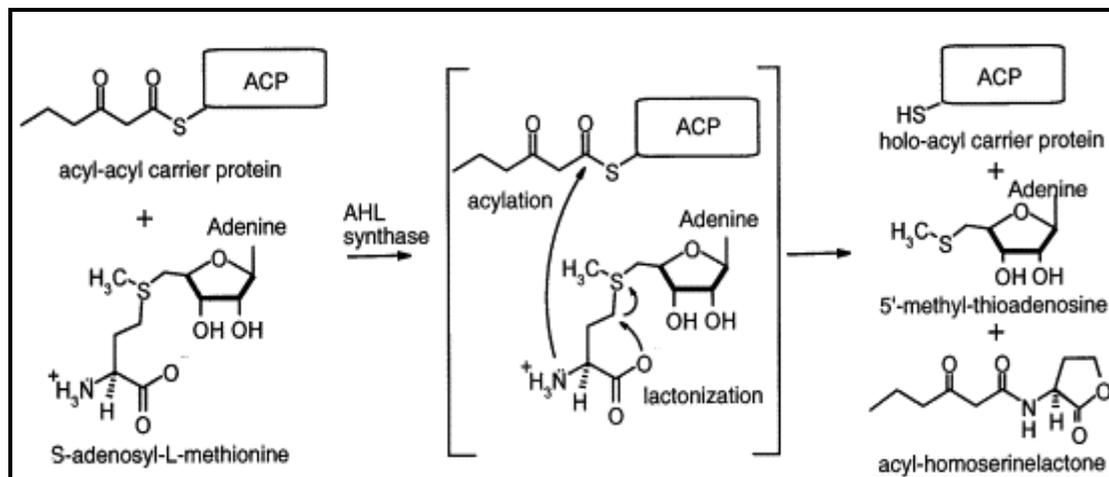


Figure 5 : Synthèse des N-Acyl-Homosérine Lactones (Watson *et al.*, 2002)

Après les réactions d'acylation et de lactonisation, le produit AHL et les sous-produits holo-ACP et 5'-méthylthioadenosine sont libérés. L'enzyme synthase condense du S-Adenosyl-L-Méthionine (SAM) avec l'acyl provenant d'acyl-ACP (acyl-Acyl Carrier Protein), entraînant le départ d'holo-ACP. Puis l'enzyme synthase catalyse la réaction de lactonisation entraînant le départ de 5'-méthyle-thioadenosine et la formation de l'AHL.

2.4. Facteurs régulés par le QS

P. aeruginosa possède un grand nombre de facteurs de virulence jouant un rôle dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus. Chez *P. aeruginosa*, les systèmes *las* et *rhl* régulent près de 10 % des gènes du génome (Schuster *et al.* 2003). Selon une étude protéomique, 24 % des protéines détectées sont régulées par QS (Arevalo-Ferro *et al.*, 2003).

2.4.1. Facteurs de virulence associés à la bactérie

2.4.1.1. Biofilm

Un biofilm correspond à une population de bactéries organisées en une communauté structurée adhérente à une surface et enrobée d'une matrice extracellulaire EPS (Extracellular polymeric substance matrix). Cette matrice représente 85 % de la biomasse du biofilm total, et est composée principalement de biomolécules, des exopolysaccharides, de l'ADN extracellulaire (eDNA) et des polypeptides (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Selon les souches de *P. aeruginosa* et /ou les conditions nutritionnelles, différents phénotypes de biofilms peuvent être développés (Shrout *et al.*, 2006).

Chez *P. aeruginosa*, les EPS sont caractérisés par la présence d'alginate, un polysaccharide linéaire qui participe à la structuration du biofilm (Boyd et Chakrabarty, 1995 ; Hentzer *et al.* 2001). Il joue un rôle d'adhésine. Une surproduction d'alginate est observée chez les souches issues de patients atteints de mucoviscidose, cette surexpression protège *P. aeruginosa* de la phagocytose, des agents antimicrobiens et des réponses de l'hôte. D'autres systèmes de polysaccharide indépendants du système Alg (Responsable de la synthèse d'alginate), participant à la structuration et la stabilité du biofilm, ont été mis en évidence, le système Pel et le système Psl (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

La formation de biofilm de *P. aeruginosa* se déroule en 5 étapes majeures (Fig. 6) : tout d'abord, les bactéries adhèrent à une surface qui peut être d'origine inorganique comme des tuyaux de plomberie, des cathéters, ou organique, comme les cellules des hôtes eucaryotes, par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on parle d'adhérence (Fig. 6 étape 1). Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pili, et commencent à former des microcolonies dans la matrice d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'adhésion (Fig. 6 étape 2).

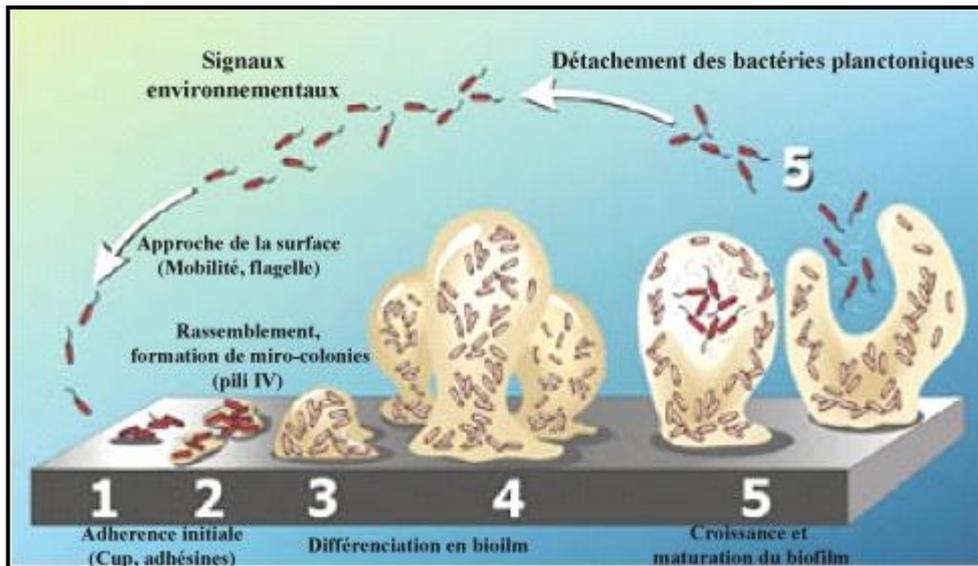


Figure 6 : Modèle de formation d'un biofilm chez *P. aeruginosa* (Mahami et Adu-Gyamfi, 2011)

Progressivement, les microcolonies bactériennes se développent à un phénotype plus structuré avec un espace non colonisé (Fig. 6 étape 3). Ensuite, les espaces non colonisés sont remplis de bactéries, qui couvrent enfin toute la surface (Fig. 6 étape 4). Pendant ce temps, on observe la croissance des communautés tridimensionnelles (Fig. 6, étapes 3 et 4). Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm (Fig. 6 étape 5), et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle d'essaimage du biofilm (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

2.4.1.2. Flagelle et pili

La mobilité, en liaison avec les variations de l'environnement, est un phénomène primordial dans le processus de colonisation et d'infection.

P. aeruginosa possède un seul flagelle polaire qui lui confère la capacité de se déplacer non seulement en milieu aqueux (Swimming), mais également sur des surfaces semi-solides (Swarming) (Kohler *et al.*, 2000). Il est composé d'un filament permettant la mobilité, d'un crochet et d'un corps basal ancré dans les membranes bactériennes. Le filament est constitué de monomères d'une protéine appelée flagelline (FliC) (Bardy, Ng, et Jarrell, 2003).

Le flagelle est impliqué dans la reconnaissance et l'adhérence aux surfaces épithéliales (Simpson, Ramphal et Lory, 1992) et joue un rôle important dans les stades précoces du développement du biofilm bactérien (O'Toole et Kolter, 1998). Il participe également à la virulence en induisant une réponse inflammatoire (Adamo *et al.*, 2004).

La mobilité implique également les pili de type IV. Constitués d'empilement de monomères d'une protéine appelée piline (PilA) (Mattick, 2002). Ils sont nécessaires à l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales (Hahn, 1997).

2.4.1.3. Lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide (LPS), un constituant des bactéries à Gram négatif, localisé dans la membrane externe. Il joue un rôle protecteur contre la lyse. Le LPS est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus hôtes. Il se compose de trois parties :

- Le lipide A, une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la bicouche lipidique, aussi appelée endotoxine. Il est impliqué dans la stimulation excessive du système immunitaire et peut ainsi être à l'origine de chocs septiques (Ernst *et al.*, 2003).
- Un cœur oligosaccharidique hydrophile constitué de chaînes polysaccharidiques.
- L'antigène O, une partie polysaccharidique variable. Il est possible qu'il soit présent (phénotype lisse) ou absent (phénotype rugueux) sur le cœur oligosaccharidique. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme le plus virulent (Cryz *et al.*, 1984).

2.4.2. Facteurs de virulence sécrétés

2.4.2.1. Enzymes protéolytiques

P. aeruginosa sécrète plusieurs types de protéases agissant en synergie pour dégrader les protéines et interférer avec le système immunitaire de l'hôte. Toutes ces enzymes ont des substrats protéiques différents.

i) Exotoxine A

C'est la protéine la plus cytotoxique produite par *P. aeruginosa* jouant un rôle majeur dans la virulence de la bactérie. Un mutant déficient en *ExoA* est 20 fois moins virulent chez la souris que la souche sauvage (Miyazaki *et al.*, 1995). Elle est composée de deux domaines : un domaine qui inhibe la synthèse protéique des cellules hôtes des eucaryotes. Le second domaine interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de l'hôte permettant ainsi la translocation dans la cellule cible (Gallant *et al.*, 2015).

ii) Elastases

L'activité élastolytique est due à deux protéines LasA et LasB contrôlées par le *QS*. LasB est une métalloprotéinase à zinc. Elle occupe une place importante dans la pathogénicité, car elle peut dégrader ou inactiver de nombreuses protéines hôtes : des composants des lames basales, des structures épithéliales (L'élastine, la laminine, les collagènes de types III et IV, les protéoglycanes) et les composants du complément (C1q et C3), les immunoglobulines A et G, ou l'inhibiteur de l' α 1-protéinase sérique (Le Berre *et al.*, 2006).

iii) Protéase alcaline

La protéase alcaline est une métalloprotéase à zinc de 50 kDa codée par le gène *aprA* et contrôlée par le *QS*. Elle dégrade efficacement les composantes du complément ainsi que les cytokines impliqués dans la réponse immune et inflammatoire telles que l'INF- γ et le TNF- α (Laarman *et al.*, 2012).

2.4.2.2. Phospholipases C

Elles ont particulièrement pour cible la partie lipidique de la membrane des cellules eucaryotes. Elles déstabilisent la membrane des cellules de l'hôte et sont à l'origine de la mort cellulaire (Vasil *et al.*, 2009). Elles déstabilisent les défenses de l'hôte en empêchant une réponse oxydative des neutrophiles (Terada *et al.*, 1999).

2.4.2.3.. Pyocyanine

La pyocyanine (1-hydroxy-5-méthyl-phénazine) est un pigment bleu-vert sécrété par la bactérie et il est impliqué dans la virulence (Lau *et al.*, 2004). Il s'agit d'un dérivé de phénazine très toxique pour les cellules eucaryotes et procaryotes. En effet, la pyocyanine réduit la réponse immunitaire de l'hôte en induisant l'apoptose des neutrophiles (Allen *et al.*, 2005) et augmentant la production de l'IL-8 (Denning *et al.*, 1998). De plus, ses propriétés oxydoréductrices lui permettent d'oxyder le glutathion, d'inactiver la catalase des cellules épithéliales bronchiques et ainsi de participer aux lésions liées au stress oxydatif (O'Malley *et al.*, 2006).

2.4.2.4. Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires. Ils ont une activité de détergent et peuvent émulsifier les phosphates membranaires facilitant ainsi l'accès aux phospholipases. L'expression des rhamnolipides est coordonnée et régulée par le système de *QS RhlR/RhlI* (Pesci *et al.*, 1997). Ils sont impliqués dans la mobilité de type

swarming (Kohler *et al.*, 2000) et participent également à la structuration du biofilm, et le détachement des bactéries du biofilm (Boles, Thoendel et Singh, 2005). Ils inhibent également la phagocytose (McClure et Schiller, 1996).

2.5. Inhibition de la virulence bactérienne par dégradation enzymatique des signaux QS

L'utilisation d'antibiotiques au cours du dernier centenaire a permis de réduire la mortalité liée aux infections bactériennes. Malgré cette avancée, les infections bactériennes restent la première cause de décès et de maladies dans le monde (Dong, Wang et Zhang, 2007).

En février 2017, L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a rendu publique la liste des 12 bactéries pour lesquelles, il y a une véritable urgence d'avoir de nouveaux antibiotiques. Parmi ces bactéries un groupe critique de germes multi-résistants et comporte : *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *E.coli*, *Serratia*, et *Proteus*. Elles peuvent provoquer des infections sévères, souvent mortelles, telles que les septicémies et les pneumonies.

Cette liste d'agents pathogène prioritaire et responsables de 700000 décès par an, pour le développement de nouveaux antibiotiques, comporte trois niveaux de risque :

Priorité 1: Critique : résistance aux antibiotiques les plus récents dits de dernier recours

1. *Acinetobacter baumannii*, résistance aux carbapénèmes
2. *Pseudomonas aeruginosa*, résistance aux carbapénèmes
3. Enterobacteriaceae, résistance aux carbapénèmes, production de BLSE

Priorité 2: Élevée

1. *Enterococcus faecium*,
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Helicobacter pylori*
4. *Campylobacter* spp.
5. *Salmonellae*
6. *Neisseria gonorrhoeae*

Priorité 3: Moyenne

1. *Streptococcus pneumoniae*
2. *Haemophilus influenzae*
3. *Shigella* spp.

De plus, l'utilisation massive d'antibiotiques et la vitesse d'émergence des résistances ont rendu le développement de nouveaux antibiotiques peu attractif (Hentzer *et al.*, 2003; Bjarnsholt *et al.*, 2010), nécessitant l'étude de nouvelles stratégies de lutte. Or, la virulence bactérienne est régulée par QS (Popat, Crusz, et Diggle, 2008), faisant de ce mécanisme une cible thérapeutique potentielle. Non bactéricide, cette stratégie antipathogénique, visant à inhiber le QS, présente le grand intérêt de limiter l'émergence de résistances puisque elle permet aux micro-organismes de se développer de manière commensale (Hiblot, 2013).

De nombreux laboratoires ont donc axé leur recherches sur ces organismes qui inhibent le QS et sur les stratégies ciblant le QS, regroupées sous le terme de *quorum quenching* (QQ) (Dong *et al.*, 2001).

2.5.1. Types d'enzymes dégradant les AHL

Plusieurs enzymes responsables de l'inactivation des signaux QS ont été identifiées et sont regroupées en trois groupes selon le type d'activité enzymatique : lactonase, acylase et oxydoréductase (Fig. 7). Ces enzymes ont été caractérisées chez des organismes bactériens et eucaryotes. Les différentes enzymes de dégradation des AHL sont présentées dans le tableau 1

2.5.1.1. Acylases

Les enzymes à activité acylase coupent les molécules d'AHL au niveau de la liaison amide entre l'homosérine lactone et la chaîne acyl (Fig. 7). Ces réactions produisent donc un acide gras et l'homosérine lactone (Leadbetter et Greenberg, 2000).

2.5.1.2. Oxydoréductases

Leur activité modifie les chaînes acyles des AHL sans les dégrader (Fig. 8). Cette activité a été découverte, dans un premier temps, chez *Rhodococcus erythropolis* (Uroz *et al.*, 2005). L'étude de son mécanisme de modification des AHL révèle que les signaux substitués 3-oxo, avec les chaînes acyl de C8 à C14, sont convertis en dérivés 3-hydroxy correspondants (Chen *et al.*, 2013).

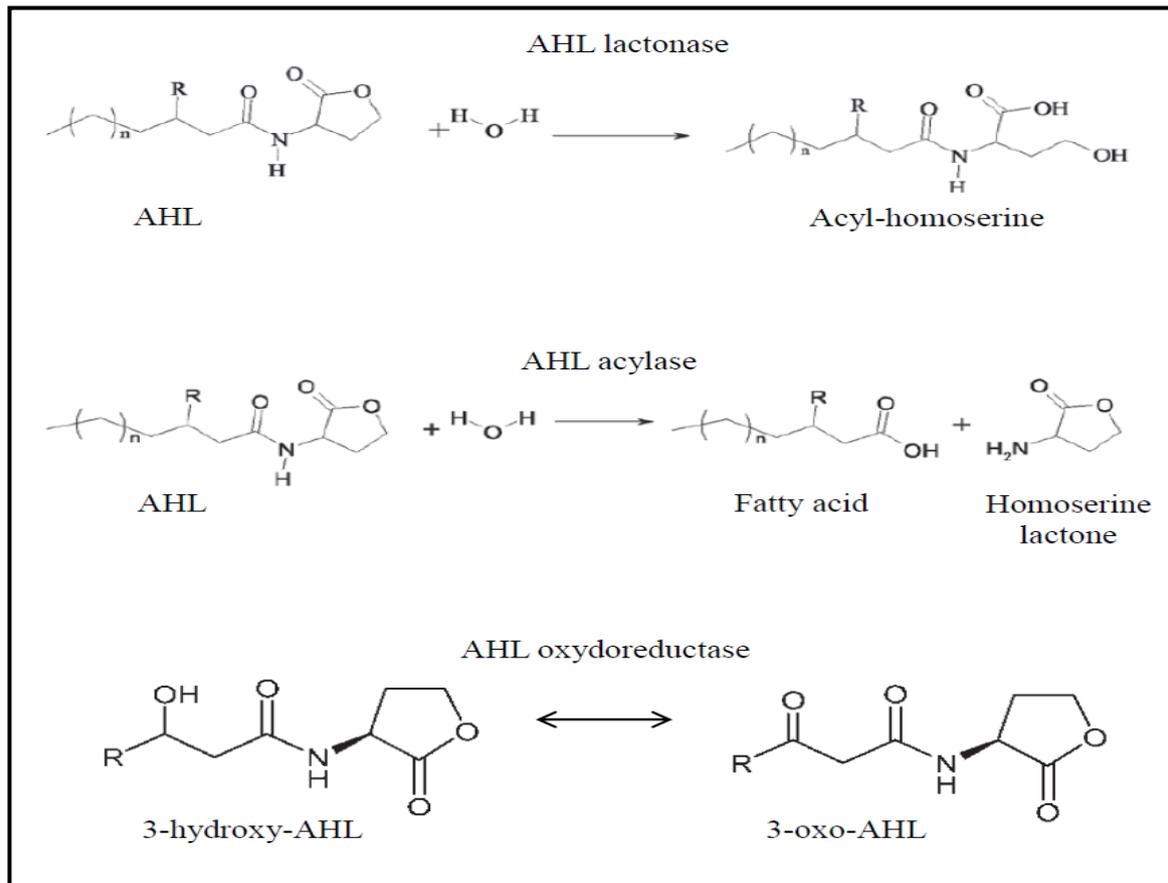
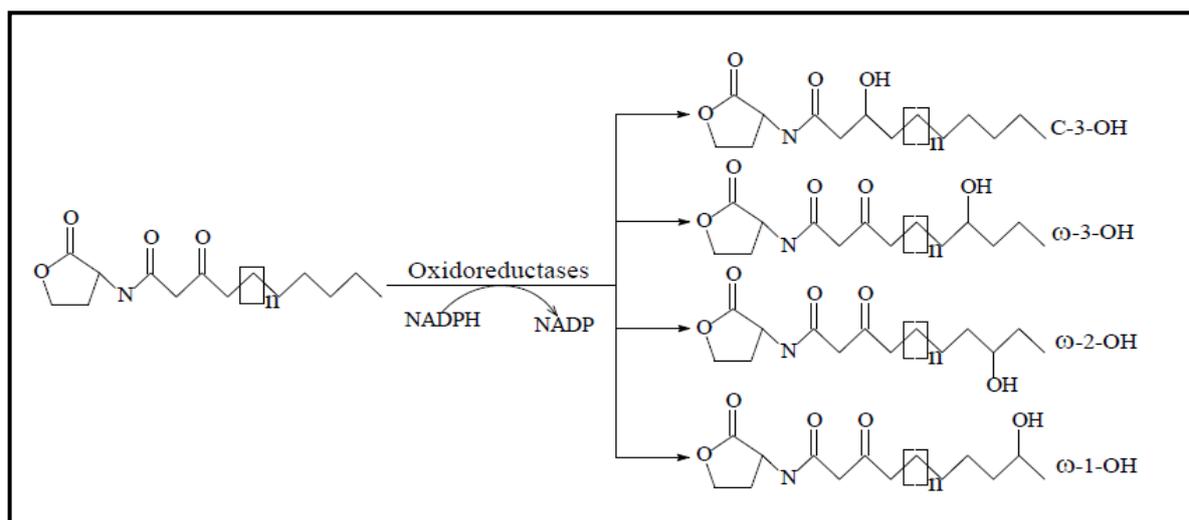


Figure 7: Types d'activité enzymatique de dégradation des AHL

Figure 8: AHL réduite par les oxydoréductases en substituant l'oxo-groupe aux positions C3 ou ω -1, ω -2 et ω -3 avec un groupe hydroxyle (Chen *et al.*, 2013)

2.5.1.3. Lactonases

Les lactonases hydrolysent la liaison ester du cycle lactone des AHL. On distingue trois familles distinctes au sein des enzymes de dégradation des AHL à activité lactonase : les métallo- β -lactamases, les paraoxonases et les phosphotriestérases-like-lactonases.

i) Les métallo- β -lactamases

L'enzyme AiiA est la première lactonase décrite et la mieux caractérisée. Cette enzyme a initialement été isolée de *Bacillus subtilis* (Dong *et al.*, 2002). Elle est responsable de l'ouverture du cycle lactone des AHL, ce qui rend la molécule inactive. La longueur de la chaîne d'acide gras influe peu sur son activité. C'est pourquoi les lactonases peuvent dégrader différents types d'AHL (Dong et Zhang, 2005). Trois sous-classes ont été identifiées : B1, B2 et B3, et partagent cinq motifs signatures conservés, le plus caractéristique est le motif : H116-X-H118-X-D120-H121 (Bebrone, 2007).

ii) Les paraoxonases

Les paraoxonases (PONs) sont des enzymes capables d'hydrolyser les phosphotriesters, dont elle tire leur nom. Ces enzymes hydrolysent aussi de nombreux autres composés comme les esters et les lactones (Khersonsky et Tawfik, 2005; Dong *et al.* 2007). En général, les PONs ont plus d'affinité pour les AHL à chaînes longues (Chun *et al.*, 2004). Elles ont été identifiées chez des mammifères (Draganov et La Du 2004). Le génome humain code pour trois PONs (hPON1 à 3). La protéine PON1, purifiée de sérum humain, présente une forte activité de dégradation de la 3-oxo-C12-AHL produite par *P. aeruginosa* (Ozer *et al.*, 2005).

iii) Les phosphotriestérases-like-lactonases (PLL)

Les PLL sont des lactonases naturelles présentant une activité de promiscuité phosphotriestérase (et estérase) (Afriat *et al.*, 2006). Ces enzymes sont très proches des phosphotriestérases (PTE). Elles sont retrouvées chez de nombreux organismes procaryotes (bactéries et Archaea) mais n'ont jamais été identifiées chez des eucaryotes (Mandrigh, Merone, et Manco 2010). La première PLL caractérisée est la protéine QsdA de *Rhodococcus erythropolis* W2 (Uroz *et al.*, 2005) et la première structure obtenue est celle de SsoPox isolée de *Sulfolobus solfataricus* (Elias *et al.*, 2008).

Les PLL sont constituées de deux sous-familles A et B en fonction de leurs préférences en substrats et de différences structurales entre elles (Afriat-Jurnou *et al.*, 2012).

Les PLL-A hydrolysent efficacement les AHL et les oxo-lactones. Les PLL-B hydrolysent préférentiellement les oxo-lactones.

La capacité des PLL-A à dégrader les AHL est particulièrement intéressante pour le développement de stratégies basées sur le QQ. Cette sous-famille compte parmi ses représentants de nombreuses enzymes issues d'organismes extrémophiles telles *SsoPox*, *SacPox* ou *SisLac* qui présentent un fort potentiel applicatif (Remy *et al.*, 2016). Parmi ces PLL, *SsoPox* sera détaillée dans la partie suivante.

Tableau 1: Enzymes de dégradation des AHL (Kalia, 2015)

Species/origin	Enzyme	Enzyme family	Target signal/activity	Reference
<i>Bacillus</i> sp.	AiiA	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Dong <i>et al.</i> (2000)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AttM	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Zhang <i>et al.</i> (2002)
	AiiB	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Carlier <i>et al.</i> (2003)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AhIK	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Park <i>et al.</i> (2003)
<i>Arthrobacter</i> sp.	AhID	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Park <i>et al.</i> (2003)
<i>Mesorhizobium loti</i>	MLR6805	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Funami <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizobium</i> sp.	DihR	Dienelactone hydrolase	AHL lactonase	Krysciak <i>et al.</i> (2011)
	QsdRI	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	
<i>Chryseobacterium</i> sp.	AidC	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>Solibacillus silvestris</i>	AhIS	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Morohoshi <i>et al.</i> (2012)
<i>Tenacibaculum</i> sp.	Aii20J	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Otero <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	QsdA	Phosphotriesterase	AHL lactonase	Uroz <i>et al.</i> (2008)
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	GKL	Phosphotriesterase	AHL lactonase	Chow <i>et al.</i> (2010)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	SsoPox	Phosphotriesterase	AHL lactonase	Merone <i>et al.</i> (2005)
<i>Mycobacterium avium</i>	MCP	Phosphotriesterase	AHL lactonase	Chow <i>et al.</i> (2009)
<i>Microbacterium testaceum</i>	AiiM	α/β hydrolase	AHL lactonase	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>Ochrobactrum</i> sp.	AidH	α/β hydrolase	AHL lactonase	Mei <i>et al.</i> (2010)
	AiiO	α/β hydrolase	AHL acylase	Czajkowski <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i>	QsdH	GDSL-like hydrolase	AHL lactonase	Huang <i>et al.</i> (2012)
Soil metagenome	QIcA	Metallo- β -lactamase	AHL lactonase	Riaz <i>et al.</i> (2008)
Soil metagenome	BpiB01 BpiB04 BpiB05 BpiB07 BpiB09	Glycosyl hydrolase Dienelactone hydrolase NADP-dependent dehydrogenase/reductase	AHL lactonase AHL lactonase AHL lactonase AHL lactonase AHL oxido reductase	Bijtenhoorn <i>et al.</i> (2011 a. b), Schipper <i>et al.</i> (2009)
<i>Ralstonia</i> sp.	AiiD	Nln hydrolase	AHL acylase	Lin <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PvdQ QuiP HacB	Ntn hydrolase Ntn hydrolase Nln hydrolase	AHL acylase AHL acylase AHL acylase	Huang <i>et al.</i> (2003) Huang <i>et al.</i> (2006) Wahjudi <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas syringae</i>	HacA	Nln hydrolase	AHL acylase	Shenherd et Lindow (2009)
	HacB	Nln hydrolase	AHL acylase	
<i>Brucella melitensis</i>	AibP	Nln hydrolase	AHL acylase	Terwagne <i>et al.</i> (2013)
<i>Streptomyces</i> sp.	AhIM	Nln hydrolase	AHL acylase	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Kluyvera citrophila</i>	KcPGA	Nln hydrolase	AHL acylase	Mukherji <i>et al.</i> (2014)
<i>Anabaena</i> sp.	AiiC	Nln hydrolase	AHL acylase	Romero <i>et al.</i> (2008)
<i>SheM anella</i> sp.	Aac	Nln hydrolase	AHL acylase	Morohoshi <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus megaterium</i>	CY P102A1	Cytochrome P450	AHL oxidoreductase	Chowdhary <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas</i> sp.	CarAB	Carbamoyl phosphate synthase	DSF	Newman <i>et al.</i> (2008)
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	Hod	Dioxygenase	PQS	Pustelny <i>et al.</i> (2009)
<i>E. coli</i>	LsrK	Kinase	AI-2	Roy <i>et al.</i> (2010)
	LsrG	-	AI-2	Marques <i>et al.</i> (2011)

2.5.2. Enzyme *SsoPox*

SsoPox est la première PLL caractérisée (PLL-A). Cette enzyme est isolée d'une archée hyperthermophile des sources d'eau chaude du Vésuve *Sulfolobus solfataricus* (50-87°C ; pH 2 - 5,5) (Auernik, Cooper et Kelly, 2008). Elle a été étudiée pour sa capacité à hydrolyser les pesticides, notamment le paraoxon dont elle tire son nom. Cette enzyme est extrêmement stable et active sur de larges gammes de températures (10-100 °C) et de pH (5,0-9,0) ce qui lui confère un fort potentiel biotechnologique (Del Vecchio *et al.*, 2009). Outre son activité phosphotriestérase, *SsoPox* possède également une activité lactonase qui lui permet de dégrader efficacement les AHL même à température ambiante.

La structure tridimensionnelle de *SsoPox* a été résolue et montre un repliement en tonneau (β/α)₈ légèrement tordu (Elias *et al.*, 2007). Les huit feuillets β sont à l'intérieur du tonneau formant un corps cylindrique hydrophobe et les huit hélices α (amphiphiles) à l'extérieur du tonneau (Fig. 9). Elle comporte un site actif contenant deux cations métalliques divalents coordonnés par quatre histidines, un acide aspartique et une lysine carboxylée (Elias *et al.*, 2008). Le centre bi-métallique participe à la catalyse en tant qu'acide de Lewis impliqué dans l'activation d'une molécule d'eau en ion hydroxyde pour l'attaque nucléophile du substrat. Contrairement à d'autres phosphotriestrases connues présentant une organisation structurale similaire, *SsoPox* diffère selon la longueur de deux boucles 7 et 8, respectivement plus courte et plus longue que celles des PTE. Ces modifications structurales engendrent la formation d'un canal hydrophobe qui accommode parfaitement les substrats de type lactone.

L'activité lactonase de *SsoPox* a par ailleurs été améliorée par ingénierie enzymatique du résidu W263 (Remplacement du résidu tryptophane par les vingt acides aminés possibles (Hiblot *et al.*, 2013). Ce résidu a été particulièrement considéré car il est situé dans le site actif et impliqué dans les mouvements de boucles. Une expérience de mutagenèse à saturation a permis d'identifier un variant extrêmement efficace, *SsoPox*-W263I, montrant des efficacités catalytiques allant jusqu'à $5,8 \times 10^6 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Hiblot *et al.*, 2013).

L'enzyme sauvage et ses variantes sont capables d'hydrolyser une vingtaine de lactones soulignant leur grande promiscuité de substrats. Ils résistent de plus à l'action des protéases, détergents et des solvants organiques (Hiblot *et al.*, 2012; Hiblot *et al.*, 2013).

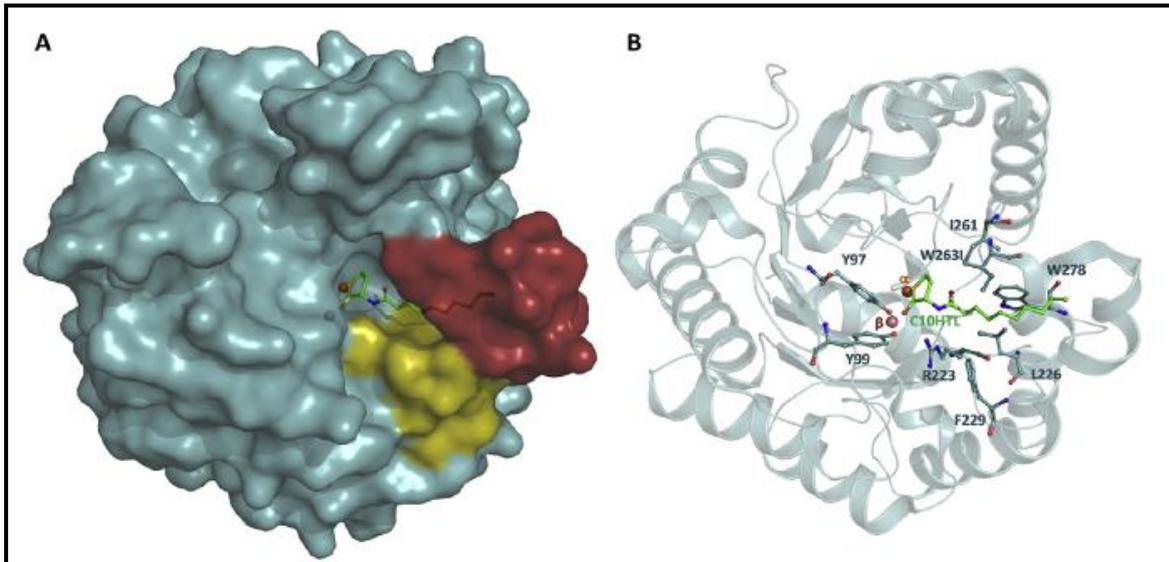


Figure 9: Structure de SsoPox-W263I (PDB ID : 4KF1): (A) Représentation en surface du complexe avec l'analogue de substrat N-decanoyl-L-homocysteinethiolactone (C10HTL). La boucle-7 et la boucle-8 sont indiquées en jaune et en rouge respectivement (B) Représentation en ruban : le C10HTL est indiqué comme un bâton vert, les résidus environnants sont indiqués par des bâtons bleus et les cations divalents sont dessinés comme des sphères.

Partie

Expérimentale

Chapitre I :

Identification rapide des
bactéries responsables des
mammites subcliniques

1. INTRODUCTION

L'identification de routine d'isolats bactériens dépend habituellement de la caractérisation phénotypique (Caractères culturels et Colorations spécifiques, propriétés biochimiques, physiologiques et sérologie). Ces techniques présentent certains inconvénients tels que le fait de nécessiter plusieurs jours pour l'analyse ou encore de ne pas donner une identification correcte voire précise.

L'utilisation de méthodes moléculaires dans la détection et la caractérisation des agents pathogènes sont largement utilisées et la plupart sont basées sur le polymorphisme du gène de l'ADNr 16S. Cependant, cette méthode ne fournit pas, elle aussi, une solution définitive pour l'identification bactérienne de routine. Elle n'est pas couramment utilisée dans les laboratoires agro-vétérinaires ou environnementaux (Tewari, Cieply et Livengood, 2011). Par conséquent, les microbiologistes ont concentré leur attention sur une technique plus rapide : la spectrométrie de masse (MS) de type MALDI-TOF pour une identification précise jusqu'à l'échelle de l'espèce.

L'objectif de cette partie expérimentale est de confronter la technique du MALDI-TOF MS par rapport aux méthodes génotypiques (*ADNr16S*, *rpoB* et *gyrB*) pour l'identification de bactéries responsables de mammites subcliniques isolées des vaches laitières, afin de vérifier la crédibilité de cette technique par rapport aux méthodes biomoléculaires. Ces dernières ont été exploitées, dans cette thèse, avec les outils bioinformatiques tels que :

- Le balsting pour situer la position taxonomique de nos isolats bactériens contre la base de données 'Nucléotide'.
- Les constructions phylogénétiques, avec le programme MEGA 5.0, pour mettre en exergue les relations de parenté entre les isolats bactériens.
- Les prédictions des structures 2D des séquences nucléiques et protéiques ainsi que la prédiction de la structure 3D dans le cas de l'enzyme GAPDH.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Description des échantillons animaux

L'étude a été réalisée sur des vaches appartenant à deux élevages laitiers situés dans deux wilayas de l'Est algérien : Constantine (Ferme pilote d'El-Baaraouia) et Batna (Djerma). Les prélèvements ont été faits en présence d'un vétérinaire et ont concerné un effectif de six vaches pour la wilaya de Constantine et huit vaches pour la wilaya de Batna (Annexe A).

1.2. Le CMT et prélèvement des échantillons de laits et leur conservation

1.2.1. Réalisation du CMT (Schalm, Carrol et Jain, 1971)

Nous avons utilisé le test CMT pour le diagnostic des mammites subcliniques, car c'est un test rapide, économique et de large utilisation pour détecter les mammites subcliniques dans un quartier.

Au début de la traite, les premiers jets de lait sont éliminés. Un volume de lait (2 mL) ont été recueillis dans une coupelle (Chaque coupelle correspondant à un quartier) et additionnés d'une quantité égale de réactif à base de la solution de Teepol à 10 % (Détergeant). Les deux volumes ont été bien mélangé par rotation puis une lecture visuelle immédiate a été réalisée afin de vérifier le changement de la consistance du mélange signe d'un cas positif de mammite subclinique (Abdel-rady, 2009).

1.2.2. Conservation des prélèvements (Bouaziz, 2005)

Un deuxième prélèvement a été réalisé sur les quartiers avec un test CMT positif pour l'analyse bactériologique. Les principales étapes du prélèvement de l'échantillon de lait de quartier pour examen bactériologique sont les suivantes :

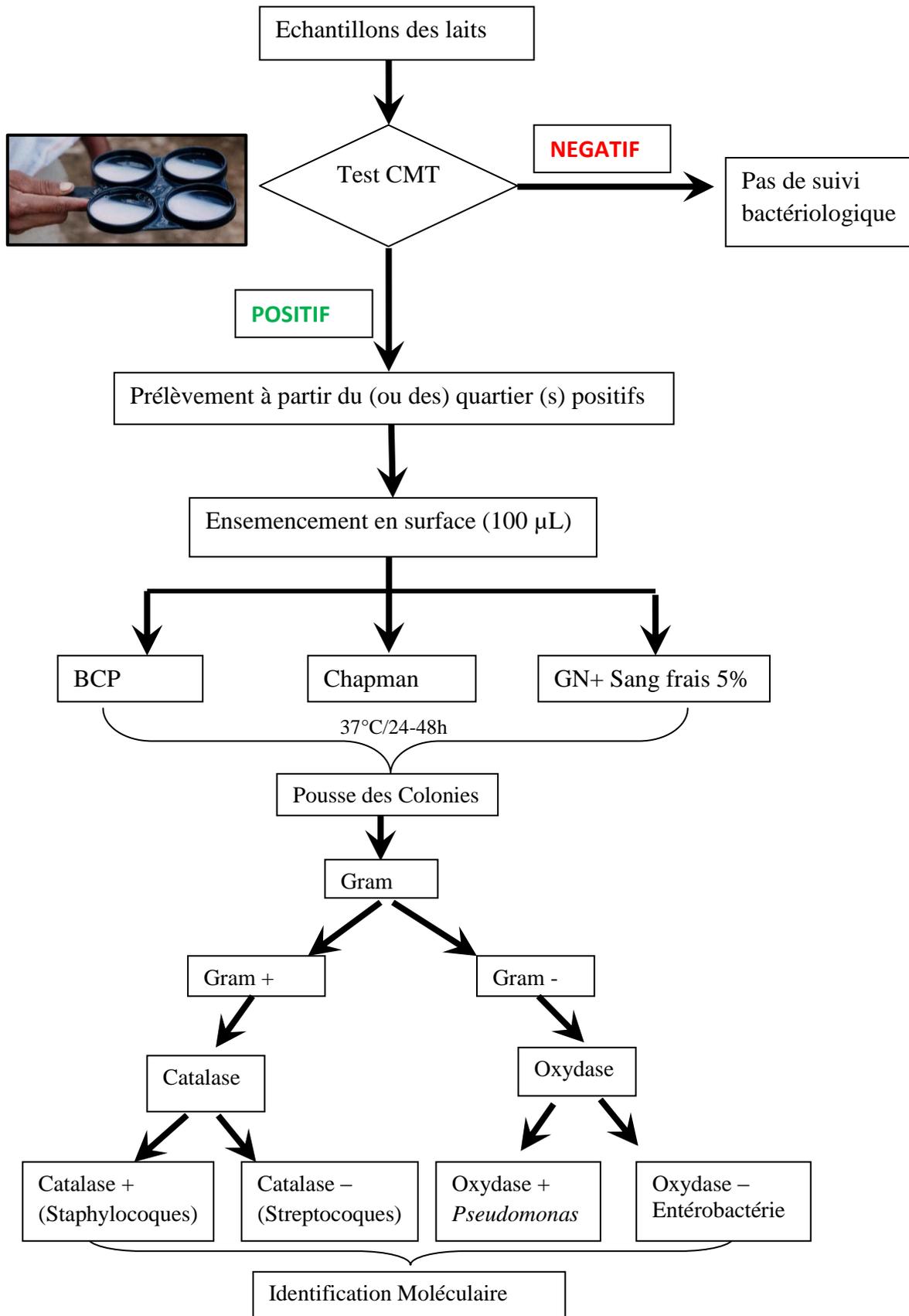
- Lavage des mains.
- Lavage et séchage des trayons.
- Désinfection de l'extrémité du trayon avec un tampon de coton imbibé d'alcool à 70°.
- Élimination des premiers jets.
- Saisir le flacon à prélèvement entre le pouce et l'index de la main gauche et le retourner de sorte que le bouchon soit dirigé vers le bas.
- Dévisser le bouchon avec la main droite et le porter entre l'index et le médium de la main gauche. Tube et bouchon ont alors leur ouverture dirigée vers le bas afin d'éviter toute contamination.
- Saisir le trayon de la main droite, le ramener en position latérale et traire presque horizontalement dans le flacon incliné au moment où le lait gicle
- Refermer le flacon avant de le redresser.
- Identifier le flacon en inscrivant la date, le code de l'animal et le quartier prélevé.

Les prélèvements ont été transportés dans une glacière et conservés à 4 °C et analysés dans un délai inférieur à 24 h.

1.3. Isolement et tests phénotypiques (Organigramme)

Les échantillons de lait ont été ensemencés en surface à raison de 10 μ L de lait par boîte de Pétri sur les milieux suivants (Bouaziz, 2005; Gabli, 2005)

1. Milieu de Chapman (Recherche des Staphylocoques),
2. Milieu B.C.P (Gélose lactosée au Pourpre de BromoCrésol pour la recherche des entérobactéries).
3. Gélose au sang frais de mouton (5 %) (Recherche des germes exigeants).



Organigramme : Démarche pour l'isolement et l'identification des germes rencontrés dans l'étude

1.4. Identification par MALDI-TOF MS

1.4.1. Préparation de la matrice et dépôt de l'échantillon

La matrice utilisée a été préparée avec l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique dans un mélange de 475 µL d'eau de qualité HPLC, 25 µL d'acide trifluoroacétique et 500 µL d'acétonitrile dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Après avoir vortexé la solution pendant quelques secondes, elle est soniquée pendant 10 min. Puis la solution est centrifugée pendant 5 min à 13000 g. Le surnageant retenu et utilisé comme matrice.

Trois dépôts distincts ont été effectués pour les différents isolats (n=14), à partir de trois colonies différentes pour chaque isolat (Soit n=14x3), sur la cible MSP 96 (Nous avons utilisé des cultures fraîches sur gélose au sang de mouton, incubées pendant 24 h à 37 °C). Une fois le dépôt a séché à température ambiante, il a été recouvert par une goutte de 1,5 µL de la solution matrice. Une deuxième étape de séchage est nécessaire pour introduire la plaque dans l'automate afin de l'analyser.

1.4.2. Lancement du MALDI-TOF MS et interrogation de la base de données

Le système proposé par Bruker Daltonics est composé d'un spectromètre Microflex et du logiciel Biotyper3.0 (Bruker Daltonics), pour l'identification des bactéries, mycobactéries, champignons, et d'autres échantillons.

Les données des spectres sont analysées en prenant en compte la position, la fréquence des pics et leur intensité. Ils sont ensuite comparés à une base de données issue de répétitions spectrales de souches de référence. Les spectres de masse de nos échantillons sont analysés grâce au logiciel Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics). Les spectres ont été enregistrés en mode linéaire positif pour la gamme de masse de 2000 à 20000 Da. Cette identification étant basée sur la comparaison de la position, la fréquence et l'intensité des pics du spectre de masse inconnu avec tous les spectres typiques enregistrés dans la banque de données d'empreintes spectrales de souches de référence.

Un score de correspondance basé sur les masses identifiées et leur corrélation d'intensité est généré et utilisé pour le classement des résultats. Un score supérieur à 1,9 est considéré comme une identification très probable d'espèce, entre 1,7 et 1,999 comme une identification probable de genre, requérant d'autres tests. Les scores inférieurs à 1,699 ne permettent pas d'identification et l'échantillon doit être repassé ou soumis à d'autres tests.

1.5. Identification génotypique des isolats

1.5.1. Identification par séquençage de l'ADNr 16S

1.5.1.1.Extraction de l'ADN

Nous avons utilisé l'automate EZ1 BioRobot (EZ1 XL) de QIAGEN selon le protocole d'extraction EZ1 Advanced XL Sample & Assay Technologies. La technique des particules magnétiques donne à l'ADN une haute qualité. Elle est utile pour une utilisation directe d'amplification. Le rendement dépend de la souche bactérienne, de la densité, du volume d'échantillon et du volume d'éluion.

Le kit EZ1 DNA Tissue (Qiagen) a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Une suspension cellulaire est préparée dans 100 µL d'eau à qualité biologie moléculaire BioRad, à laquelle sont ajoutés 80 µL de tampon de lyse G2 et 20 µL de protéinase K. L'extraction dure 15 min. Le tampon et la protéinase K vont permettre d'éliminer les protéines et libérer les acides nucléiques, qui sont ensuite capturés par les particules magnétiques. Le complexe est lavé à plusieurs reprises. Lors de l'éluion, l'éluât se détache des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient. Les éluats contenant les ADN génomiques sont alors récupérés dans des microtubes stériles et conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

1.5.1.2. Amplification de l'ADN génomique par PCR

La PCR (Standard) a consisté à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S de nos isolats à l'aide d'amorces spécifiques fD1 et rP2 (Tableau 2) encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500 bp (Weisburg *et al.*, 1991).

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur Biometra (LABGENE scientific Instruments, Archamps, France). Le mélange réactionnel d'amplification d'un volume final de 25 µL contient :

- 5 µL d'ADN extrait,
- 13 µL d'eau ultra pure
- 2,5 µL de tampon de PCR 10X,
- 1 µL MgCl₂ 15 mM (Applied biosystems, Courtaboeuf, France)
- 2,5 µL de désoxyribonucléotides-triphosphate (dNTP, 2,5 mM : dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
- 0,5 µL d'amorce sens (fD1, 10 µM)
- 0.5 µL d'amorce anti-sens (rP2, 10 µM)

- 0,25 µL de Taq-ADN polymérase (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les différentes étapes de la PCR standard comprennent une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 5 min à 95 °C. Cette étape est suivie de 39 cycles d'amplification de l'ADN avec

- 60 s à 94 °C (Dénaturation),
- 50 s à 55 °C (Appariement des amorces)
- 1 min 30 s à 72 °C (Elongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier).

Une étape finale de 7 min à 72 °C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

1.5.1.3. Contrôle de l'amplification

Après polymérisation des gènes ADN_r 16S, les échantillons ont été contrôlés sur un gel d'agarose à 1,5 %, contenant du SYBR Safe, agent intercalant, dans une cuve de migration contenant du tampon Tris-Borate-EDTA (Ethylene-Diamine Tetra-acetic Acid) : TBE 0.5X. Dans chaque puits 5 µL de produit PCR additionnés à dans 2 µL de bleu de tampon de charge ont été déposés, puis une migration, pendant 20 min à 135 volts. Le 1 Kb stepladder (Promega, USA) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées et photographiées à l'aide d'un transilluminateur à UV.

1.5.1.4. Purification des produits PCR

Afin d'être séquencés dans de bonnes conditions, les produits d'amplification doivent être débarrassés de tous les résidus de la réaction de PCR (dNTPs, amorces, *Taq* polymérase et sels). Cette purification a été opérée manuellement par ultrafiltration sur plaque Nucleofast® 96 (Macherey-Nagel), un vide est appliqué pendant 10 à 15 min à l'aide du système de pompe à vide. L'ADN est retenu par la membrane de plaque Nucleofast alors que les contaminants passent à travers et sont éliminés. L'ADN est récupéré par l'addition de 50 µL d'eau pure à la membrane portant l'ADN. L'ensemble est agité pendant 10 mn à 500 rpm pour séparer l'ADN de la membrane.

1.5.1.5. Réactions de séquences

Le séquençage a été effectué en utilisant le kit de séquençage «Big Dye Terminator Cycle Sequencing » (Applied Biosystems). Cette PCR consiste à amplifier le forward et le reverse séparément pour les séquencer. Le séquençage a été effectué en utilisant trois couples

d'amorces (Tableau 2). Le mélange réactionnel de la PCR a un volume total de 10 μ L, contenant:

- Tampon du kit BDV1 (1,5 μ L),
- Big Dey Terminator (1 μ L),
- Amorce (0,5 μ L),
- Eau pure (3 μ L),
- ADN (4 μ L).

Six tubes de PCR pour chaque isolat sont préparés. La réaction de séquençage comprend une étape de dénaturation initiale d'une minute à 95 °C suivie de 25 cycles de :

- Dénaturation à 96 °C pendant 10 s,
- Hybridation pendant 5 s à 50 °C et
- Elongation à 60 °C pendant 7 min.

Tableau 2: Amorces utilisées pour le séquençage d'ADNr 16S

	Amorces	Sequences	Taille (pb)	Tm (°C)	Références
PCR Standard	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	56	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	21	62	
PCR BigDye	536F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	18	58	(Drancourt, Bollet, <i>et Raoult</i> , 1997)
	536R	GTATTACCGCGGCTGCTG	18	58	
	800F	ATTAGATACCCTGGTAG	17	48	
	800R	CTACCAGGGTATCTAAT	17	48	
	1050F	TGTCGTCAGCTCGTG	15	48	
	1050R	CACGAGCTGACGACA	15	48	

1.5.1.6. Purification sur Sephadex

Les produits amplifiés sont ensuite purifiés par gel-filtration sur des plaques MultiScreen de Millipore. La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dessaler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La plaque 96 puits MultiScreen HV (Multiscreen Filter Plates MAHVN4550) est utilisée comme support inerte de la résine G50 (Gel sephadex G50 Sigma Aldrich). Les puits de la plaque MultiScreen HV, sont chargés par la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine en utilisant le chargeur de colonne de 45 μ L comme suit : la résine Sephadex® G-50 est déposée dans

chaque puits du chargeur de colonne, l'excès de résine est retiré avec une raclette, la plaque MultiScreen HV est alors placée à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir, l'ensemble est enfin retourné. 300 μ L d'eau ultra pure sont alors ajoutés dans chaque puits contenant de la résine, la plaque est fermée avec son couvercle et laissée 3 h à température ambiante. Une fois les mini-colonnes gonflées dans la plaque MultiScreen, elles peuvent être stockées à 4 °C. Pour l'utiliser, la plaque MultiScreen HV est alors placée sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits. L'ensemble est centrifugé 5 minutes à 1200 g pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.

Après avoir ajouté 10 μ L d'eau ultra pure aux échantillons à purifier, déposer-les délicatement au centre des mini-colonnes. Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de polypropylène au format standard 96 et centrifuger 5 min à 1200 g. Les filtrats contiennent les produits purifiés dans l'eau.

1.5.1.7. Séquençage

Le séquençage est réalisé à l'aide d'un automate (ABI-3130XL Genetic Analyser). Le résultat est présenté sous forme d'un chromatogramme.

Les séquences des fragments obtenus par les six amorces utilisées, sont des séquences qui se recouvrent en partie. À l'aide de ces parties communes entre les séquences lues, nous pouvons reconstituer la séquence consensus. Cette opération d'assemblage est réalisée par le logiciel Sequencher 4.1.4. Les séquences sont comparées aux séquences homologues des banques de données nucléiques de séquence à travers le portail NCBI⁵ en utilisant le programme BlastN spécifique des séquences nucléiques non codantes au contraire de BlastX, qui lui est destiné à Blaster des ARNm.

1.5.1.8. Alignement multiple et Analyse phylogénétique

L'alignement multiple des séquences est effectué en utilisant le logiciel MEGA 5.0 disponible sur les sites des bases de données nucléiques et protéiques et libre de droits. Les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega 5.0, selon la méthode des distances de Neighborjoining. La matrice des distances est corrigée selon le modèle Kimura à deux paramètres (α pour les transitions et β pour les transversions) (Tamura *et al.*, 2011).

⁵ <http://www.ncbi.gov/Blast.cgi>

1.5.2. Identification moléculaire par séquençage du gène *rpoB*

Cette étape a été réalisée pour tous les isolats sauf pour *Micrococcus luteus* (Isolats 2 et 9 non disponibilité des amorces). L'amplification du gène *rpoB* est réalisée en utilisant les amorces décrites dans le Tableau 3. Pour le cas des staphylocoques, l'amplification a été réalisée avec les amorces 2491F et 3554R (Drancourt *et Raoult*, 2002), pour *E. coli*, les amorces CM7F et CM31bR (Mollet, Drancourt, *et Raoult*, 1997) et les amorces Pasrprob-L et Rprob-R pour *Aeromonas* (Küpfer *et al.*, 2006).

Le mix de réaction PCR pour chaque échantillon est préparé comme expliqué dans la partie 1.5.1.2 (Page : 37). La PCR s'effectue dans un thermocycleur Biorad selon le programme suivant:

1. Dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 min,
2. 39 cycles comportant : 30 s de dénaturation à 95 °C, 30 s d'hybridation à 53 °C, 3 min d'élongation à 72 °C.
3. Une élongation finale à 72 °C pendant 10 min permettant de terminer la synthèse des brins inachevés.

Le reste des étapes est réalisé par les mêmes étapes que celles d'ADNr 16S.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard et le BigDye® du *rpoB*

	Amorce	Sequence	Taille Seq.	Tm (°C)	Référence
<i>Staphylococcus sp</i>	2491F	AACCAATTCGGTATIGGTTT	20	60	Drancourt <i>et Raoult</i> , 2002)
	3554R	CCGTCCCAAGTCATGAAAC	19		
<i>Escherichia coli</i>	CM7F	AACCAGTTCGGCGTTGGCCTGG	21	46	(Mollet <i>et al.</i> , 1997)
	CM31bR	CCTGAACAACACGCTCGGA	19		
<i>Aeromonas sp</i>	Pasrprob-L	GCAGTGAAAGARTTCTTTGGTTC	23	55	(Küpfer <i>et al.</i> , 2006)
	Rprob-R	GTTGCATGTTNGNACCCAT	19		

R : A ou G ; N : A, T, G, C.

1.5.3. Identification moléculaire par séquençage du gène *GyrB*

L'amplification du gène codant pour le gène *gyrB* a été réalisée pour l'isolat C13, car n'a pas été bien identifié par l'ADNr 16S et *rpoB*, en utilisant les amorces décrites dans le Tableau 4 (Küpfer *et al.*, 2006). Les étapes d'identification par séquençage de ce gène sont réalisées par les mêmes étapes que celles d'ADNr 16S.

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR standard et le BigDye® de la *GyrB*

	Amorce	Séquence	Taille saq.	Tm (°C)	Référence
<i>Aeromonas spp</i>	gyrB UP-1S	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	23	65	(Küpfer <i>et al.</i> , 2006)
	gyrB UP-2Sr	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC	23		
	gyrB UP-3	ACTACGAGATCCTGGCCAAG	20	56	
	gyrB UP-4	TCCTCCCAGACCAAGGAC	18		
	gyrB UP5r	GCCTTCTTGCTGTAGTCCTCT	21	60	
	gyrB UP6r	GCAGAGTCCCCTTCCACTATGTA	23		

1.5.4. Identification moléculaire par séquençage du gène *gap*

Nous avons défini les amorces pour l'amplification du gène *gap* en utilisant le logiciel Primer3 (v.0.4.0). Les oligonucléotides obtenus par le programme ont été testés sur le logiciel Primer-Blast (NCBI Blast®) dans le but de vérifier leur efficacité *in silico*. Les amorces du gène *gap* pour les 14 isolats présentaient une longueur de 18 à 25 nucléotides. La synthèse par voie chimique des amorces a été faite à l'entreprise EUROGENTEC S.A. (Liège, BELGIUM). Les caractéristiques de ces amorces sont présentées dans le tableau 5.

Les étapes d'identification par séquençage de ce gène sont réalisées par les mêmes étapes que celles d'ADNr 16S.

Tableau 5: Caractéristiques des amorces utilisées pour la PCR standard et le BigDye de la GAPDH

Isolats	Amorces	Séquences	Taille séq.(pb)	Tm (°C)
<i>Staphylococcus</i>	gapStaph F	GGTTTTGGTAGAATTGGTCG	20	56
	gapStaph R	CATTCGTTATCATACCAAGC	21	59
<i>Escherichia coli</i>	gapcoli F	TGGTCTAAGCCTGGAAAGGA	20	60
	gapcoli R	ATGGTAAACATGGCCTGCAT	20	58
<i>Micrococcus luteus</i>	gapMicro F	ATGACCAAGATCGCCATC	18	56
	gapMicro R	GAGCTTCGAGCCGATGAGG	19	60
<i>Aeromonas spp</i>	gapAero F	GCAATTCAGACAGATTGTTGG	22	52
	gapAero R	TCAGAAGAGAGGGTCGGAAA	20	56

1.6. Analyses bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques ont concerné les séquences nucléiques des gènes *ADNr16S*, *rpoB* et *gap*.

Pour le cas des séquences ADNr 16S, un BlastN a été réalisé pour confirmer la place systématique des 14 isolats par estimation de leurs homologies avec les séquences de la base de données GenBank, puis la prédiction de la structure 2D de ce gène, avec une estimation de son énergie libre (ΔG°), a été réalisée en utilisant le programme bioinformatique MFOLD.

Les séquences du gène *rpo B* ont été confrontées aux séquences de GenBank en utilisant le programme BlastX afin de vérifier l'homologie des gènes de 12 isolats ayant été concernés par cette analyse. Cette étape de blasting corrobore encore plus la place systématique de nos isolats ; car la seule confrontation avec le gène ADNr 16S ne serait pas satisfaisante pour confirmer l'espèce. En fin, les structures 2D des séquences des gènes *rpo B*, des 12 isolats, ainsi que leurs énergies libres (ΔG°) ont été calculées en utilisant le programme MFOLD.

Les séquences géniques de la GAPDH ont été alignées avec le programme BlastX pour vérifier leurs homologies avec les séquences de GenBank. Une deuxième étape a concerné la traduction de ces gènes en séquences protéiques, lesquelles ont fait l'objet d'une estimation des structures 2D et 3D. Les structures 2D des protéines du gène GAPDH ont été

prédites en utilisant le programme bioinformatique GOR IV (Garnier, Gibrat, et Robson, 1996), tandis que les structures 3D des mêmes séquences protéiques, ont été modélisées en utilisant le programme bioinformatique MODELLER (Pieper *et al.*, 2004) et le logiciel Phyre2. Les techniques de modélisation et de prédiction 3D étant :

- i. Template modeling : se basant sur un modèle 3D connu. Cette approche englobe deux méthodes : a : Homologie modeling (modélisation par homologie des séquences) et b : Threading : se basant sur la reconnaissance des coudes (Fold)
- ii. Template-Free Modeling : modélisation sans aucun modèle préalablement connu au sein des bases de données structurales. La technique utilisée dans cette approche étant la méthode *Ab initio*.

1.6.1. Prédiction de la structure secondaire des gènes ADNr 16S et *rpoB*

L'approche expérimentale (*In silico*) pour la modélisation bioinformatique de la structure 2D des gènes ADNr 16S et *rpoB* s'est basée sur les étapes suivantes :

- i. Acquisition de la structure primaire du gène : Les différentes séquences (structures primaires) ont été obtenues après amplification des gènes concernés par le séquençage. Celui-ci ayant été réalisé à l'URMITE (Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales ; Marseille - France).
- ii. Confirmation de l'homologie des séquences : L'homologie ayant été déterminée par Blasting des séquences sur le portail NCBI. Les programmes BLASTN (pour le gène ADNr 16S) et BLASTX (pour le gène *rpo B*) ont été utilisés pour cette fin. Les valeurs de scores et des E-values (égales à zéro ou très proches de zéro) confirment l'homologie de nos séquences avec celles de la base de données. On peut considérer que le seuil de 20-25% (Twilight Zone) est un minimum pour distinguer une homologie d'une ressemblance fortuite.
- iii. Programmation dynamique et prédiction de la structure 2D des gènes : Contrairement à l'algorithme combinatoire de Pipas et McMahon (1975) qui calcule toutes les tiges et boucles (voir annexe B) possibles entrant dans une quelconque structure 2D (2^n possibilités si n = taille du gène) puis détermine l'énergie minimale ΔG° de repliement de la structure 2D correspondante, nous avons utilisé l'algorithme de Zuker (1981) de même principe que celui de Nussinov (1978). L'algorithme se base sur la programmation dynamique (algorithme non combinatoire mais récursif) et prédit en des temps très courts (Van Knippenberg et Hilbers, 1986) la structure secondaire du gène

avec une énergie de repliement ΔG° minimale. Cet algorithme évalue la contribution des paires de bases prises individuellement (AU, GC : paires canoniques ou Watson et Crick et GU : paire non canonique ou Wobble) dans la structure 2D de la chaîne polynucléotidique du gène. Une seule différence entre Zuker et Nussinov réside dans le fait que Zuker considère que l'énergie d'une paire de base est calculée en fonction de la paire de base précédente (Stacking). Le programme bioinformatique utilisé pour prédire la structure 2D des gènes est le MFOLD ver 3.6. Ce programme étant opérationnel depuis sa mise sur site Internet en 1995 à l'école de médecine de l'Université Washington.

1.6.2. Prédiction des structures 2D de la GAPDH à partir des séquences

La structure 2D a été déterminée à partir des structures primaires des séquences GAPDH. Cette modélisation 2D a pour objectif principal de déterminer :

- i. les zones de la GAPDH ayant une structure hélicoïdale alpha (α -helix),
- ii. les zones ayant une structure en feuillet bêta (β -Sheets)
- iii. les zones sans structures alpha ni bêta : zones coudes ou boucles (Turns)

Cette structure 2D est en fait le résultat de la libre rotation des deux angles Phi (Φ : $C\alpha$ -NH) et Psi (Ψ : $C\alpha$ -CO) ; l'angle oméga (ω : $C'i-N_{i+1}$) étant fixe pour toutes les structures secondaires. De manière générale, les angles dièdres Phi et Psi adoptent des valeurs déterminées spécifiques de chacune des deux conformations (alpha et bêta) : pour l'hélice alpha $\Phi = -57^\circ$ et $\Psi = -47^\circ$; pour le feuillet bêta l'angle $\Phi = -139^\circ$ et l'angle $\Psi = +135^\circ$.

Les différentes combinaisons d'angles Phi et Psi, pour prédire une structure 2D, se résument dans le diagramme de Ramachandran lequel a été accompagné dans toutes les structures secondaires prédites pour GAPDH.

La prédiction des structures 2D des séquences GAPDH a été réalisée à l'aide du programme bioinformatique GOR IV (GOR : Garnier-Osguthorpe-Robson) disponible sur le serveur du Pôle BioInformatique Lyonnais (PBIL, Lyon, France)⁶. Ce programme informatique prend en considération les trois états de la structure secondaire, à savoir l'hélice α , le feuillet β et les coudes et renvoie un résultat Q3 de 65%.

⁶ https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html

Le programme GOR VI a pour principe la propension de tout acide aminé, au sein d'une séquence de taille égale à huit résidus amino-acides, à être présent dans une structure secondaire donnée (l'hélice α , le feuillet β et les coudes) (Kouza *et al.*, 2017).

Les conventions de représentation des structures 2D de base pour le programme GOR VI sont :

- i. h : helix = hélice α
- ii. e : extended strand = feuillet β
- iii. c : coil = coude (ou boucle)

1.6.3. Prédiction des structures 3D de la GAPDH à partir des séquences

Les étapes suivies pour prédire les modèles 3D protéiques sont résumées dans le diagramme suivant :

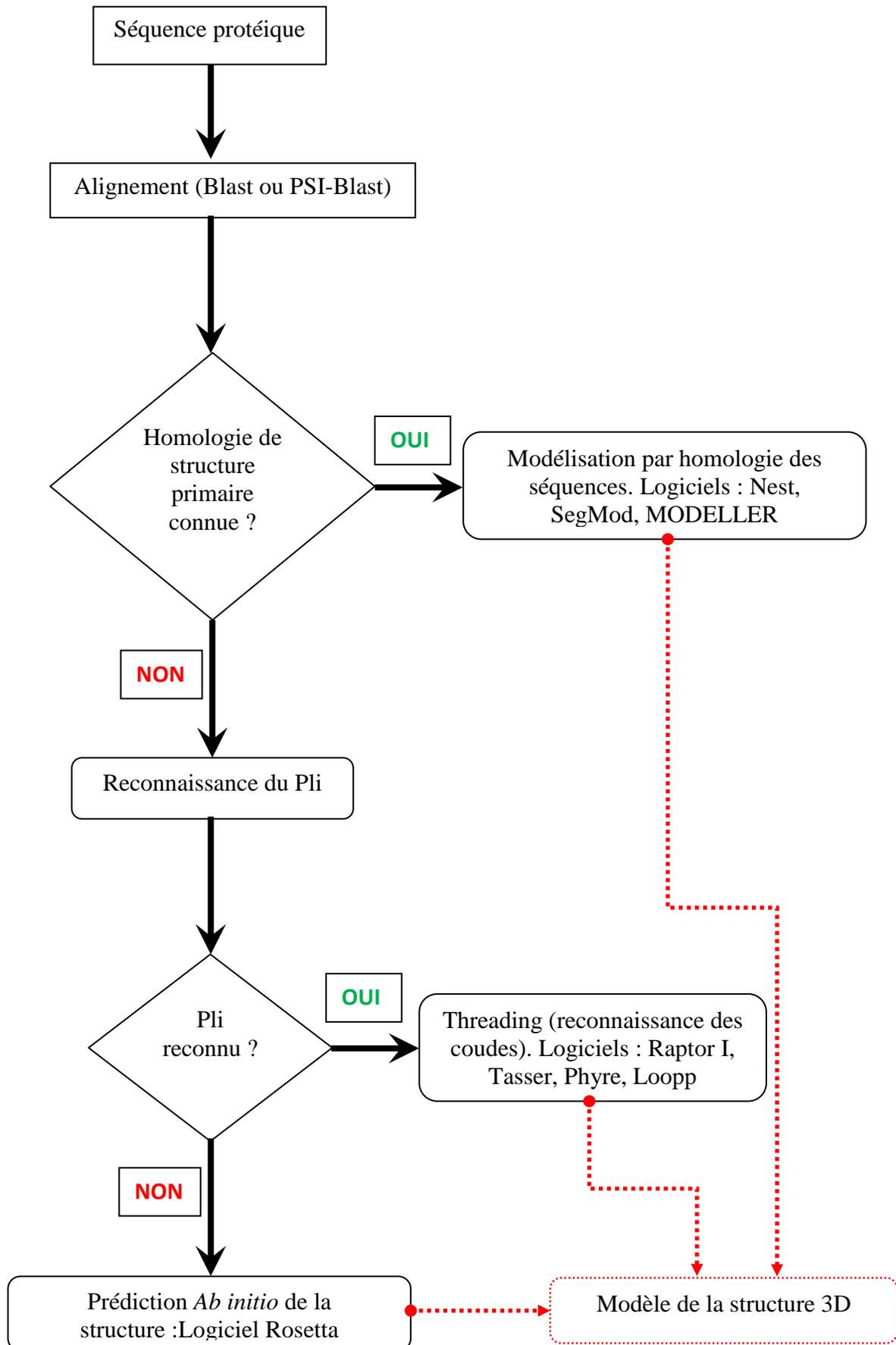


Diagramme : Etapes pour la prédiction des structures 3D

2. RÉSULTATS

2.1. Caractérisation phénotypique des isolats bactériens

Quatorze isolats bactériens (Six de Constantine et huit de Batna) ont été partiellement caractérisés en utilisant les tests physiologiques respiratoires (De l'oxydase et la catalase) et la coloration différentielle de Gram (Tableau 6).

Tableau 6: Résultats de la coloration de Gram et des tests phénotypiques respiratoires des isolats bactériens

Isolats	Tests		
	Gram	Catalase	Oxydase
B1	+	+	<i>NR</i>
B2	+	+	<i>NR</i>
B3	+	+	<i>NR</i>
C4	+	+	<i>NR</i>
B5	+	+	<i>NR</i>
B6	+	+	<i>NR</i>
C7	-	<i>NR</i>	-
C8	+	+	<i>NR</i>
B9	+	+	<i>NR</i>
C10	-	<i>NR</i>	-
B11	+	+	<i>NR</i>
C12	+	+	<i>NR</i>
C13	-	<i>NR</i>	+
B14	+	+	<i>NR</i>

+ : Test positif ; - : Test négatif ; *NR* : Non Réalisé ; B : Batna ; C : Constantine

2.2. Identification par MADI-TOF MS

Les 14 isolats bactériens ont été soumis à une analyse de cellule entière de type MALDI-TOF MS. Le "score", basé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités, est généré et utilisé pour classer les résultats. Tous les isolats testés ont donné un profil protéique visible avec un score d'identification de 2,016 à 2,223 (Tableau 7).

Tableau 7: Scores d'identification par MALDI-TOF MS

Isolat	MALDI-TOF	
	Résultats	Scores
B1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	<u>2,223</u>
B2	<i>Micrococcus luteus</i>	<u>2,149</u>
B3	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,188
C4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,228
B5	<i>Staphylococcus hominis</i>	<u>2,222</u>
B6	<i>Staphylococcus hominis</i>	<u>2,137</u>
C7	<i>Escherichia coli</i>	<u>2,16</u>
C8	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<u>2,163</u>
B9	<i>Micrococcus luteus</i>	<u>2,215</u>
C10	<i>Escherichia coli</i>	<u>2,149</u>
B11	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<u>2,189</u>
C12	<i>Staphylococcus equorum</i>	<u>2,016</u>
C13	<i>Aeromonas spp</i>	> <u>2</u>
B14	<i>Staphylococcus hominis</i>	<u>2,223</u>

Pour l'isolat C13, le MALDI-TOF a donné plusieurs espèces appartenant au genre *Aeromonas* avec les scores suivants :

- *A. salmonicida* : 2,18
- *A. bestiarum* : 2,159
- *A. eucrenophila* : 2,138
- *A. popoffii* : 2,068

La figure 10 représente les spectres de masse des différentes espèces bactériennes, réalisés par le logiciel MALDI Biotyper de Bruker.

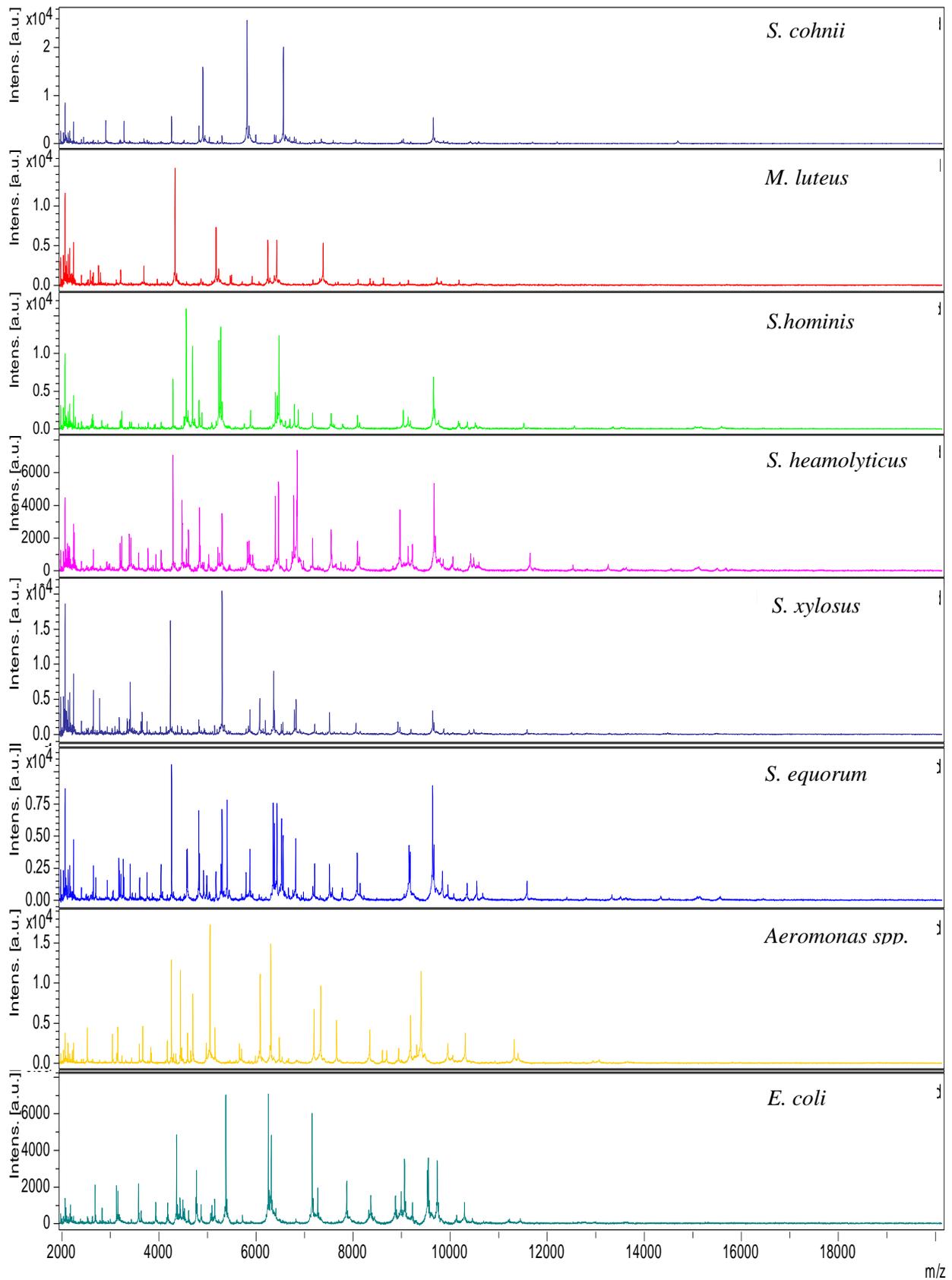


Figure 10: Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières des différents isolats bactériens

Les listes des pics dérivées à partir des spectres peuvent être utilisées aussi bien pour l'identification, que pour la génération d'un dendrogramme de classification. Le score obtenu

dans ce contexte est utilisable pour la production de dendrogrammes et l'analyse de la relation de parenté des individus (Fig. 11). Cette approche permet une véritable comparaison entre les profils protéiques des bactéries isolées.

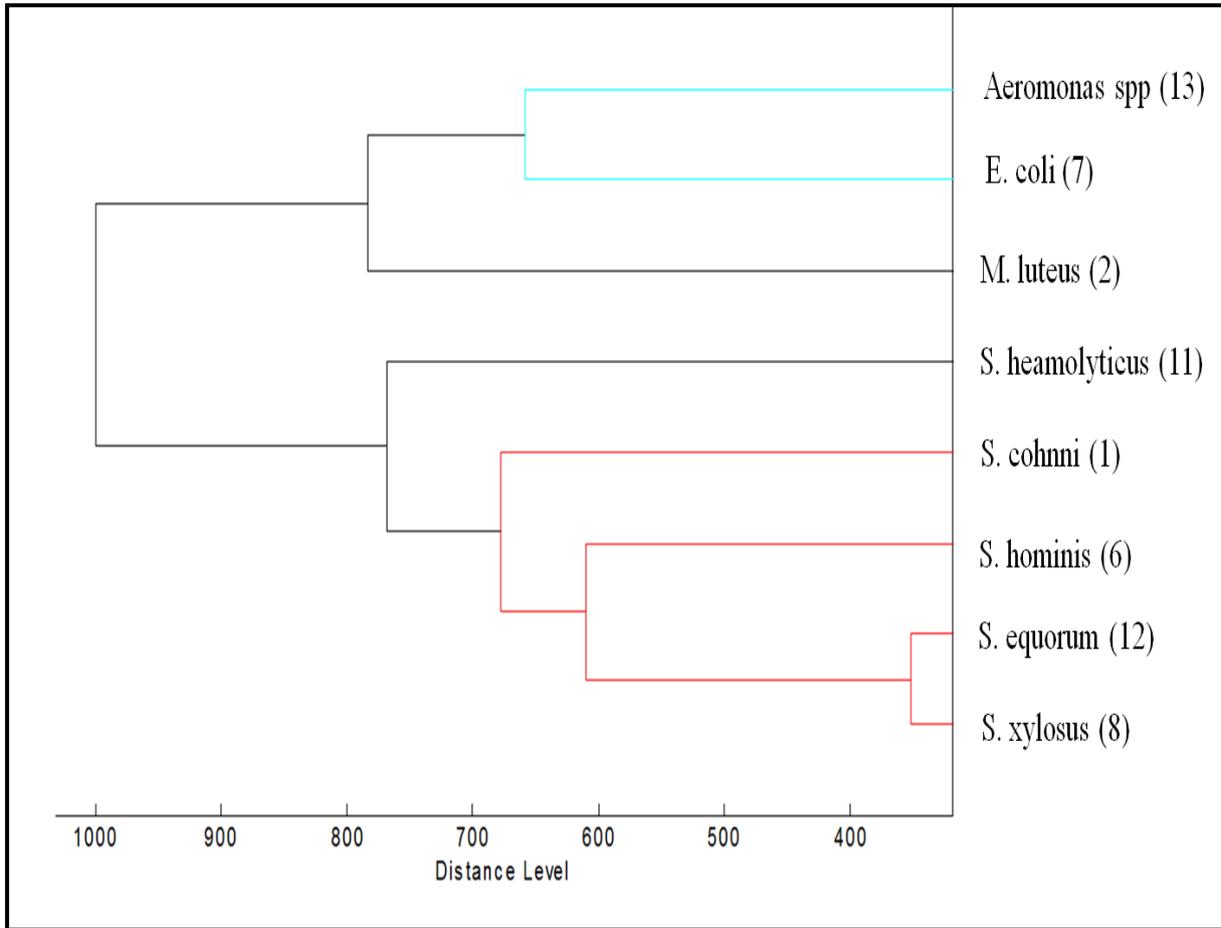


Figure 11: Dendrogramme des isolats bactériens (Sans redondance) réalisé avec le logiciel MALDI BioTyper TM 3.0 (Bruker Daltonics)

2.3. Identification génotypique

2.3.1. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S

Les amplifiats d'AND ont migré dans la région 1500 pb du gel d'agarose à 1,5 %. Une bande d'amplification unique à 1500 pb a été obtenue pour tous les isolats (Fig. 12).

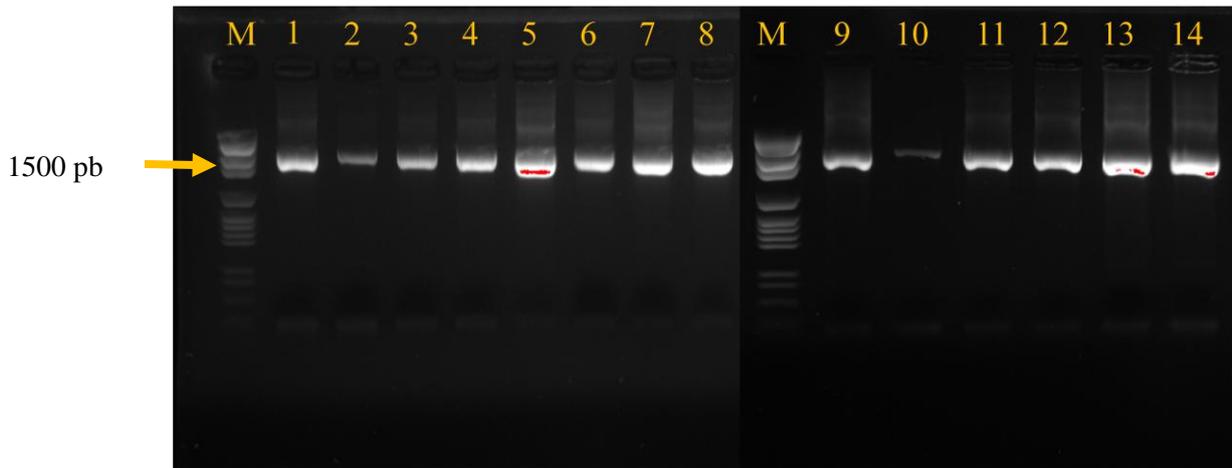


Figure 12: Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des produits d'amplification par PCR du gène ADNr 16S. M : Marqueur de taille. 1,2,...,14 : Isolats

Les résultats du séquençage des 14 isolats peuvent être consultés en annexe C. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles de la base de données Nucleotide en utilisant l'outil bioinformatique BlastN. Une bonne identification est conséquente d'un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 97% entre isolat et celle de Nucleotide (Stackebrandt et Goebel, 1994). Les séquences du gène de l'ADNr 16S obtenues ont été enregistrées dans la banque EMBL sous les numéros d'accès mentionnés dans le tableau 8. L'alignement multiple de ces séquences est présenté dans l'annexe D.

Pour l'analyse du gène de l'ADNr 16S, tous les isolats ont été correctement identifiés sauf pour :

- L'isolat C8 : sa séquence est 99,86 % identique à celle du gène de l'ADNr 16S de *S. saprophyticus* (GenBank Accession No. EU855210.1) et 99,73 % identique à celle de *S. xylosus* (GenBank Accession No. LN554884.1).
- L'isolat C13 montre un partage de similitude avec quatre espèces du genre *aeromonas*:
 - 99,66 % avec *A. salmonicida* (GenBank Accession No. AY910844.1),
 - 99,66 % avec *A. bestiarum* (GenBank Accession No. AY987755.1),
 - 99,60 % avec *A. bestiarum* (GenBank Accession No. NR_026089.2) et
 - 99,26 % avec *A. encheleia* (GenBank Accession No. NR_118042.1).

Tableau 8: Codes EMBL des séquences d'ADNr 16S pour les 14 isolats et leurs noms systématiques

Isolats	Résultats après Blasting	N° Accession (codes) sur EMBL
1 B1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	HG941657
2 B2	<i>Micrococcus luteus</i>	HG941658
3 B3	<i>Staphylococcus hominis</i>	HG941659
4 B5	<i>Staphylococcus hominis</i>	HG941661
5 B6	<i>Staphylococcus hominis</i>	HG941662
6 B9	<i>Micrococcus luteus</i>	HG941665
7 B11	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	HG941667
8 B14	<i>Staphylococcus hominis</i>	HG941670
9 C4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	HG941660
10 C7	<i>Escherichia coli</i>	HG941663
11 C8	<i>Staphylococcus xylosum</i>	HG941664
12 C10	<i>Escherichia coli</i>	HG941666
13 C12	<i>Staphylococcus equorum</i>	HG941668
14 C13	<i>Aeromonas spp</i>	HG941669

La diversité phylogénétique et la position taxonomique de ses isolats (Fig. 13) ont été évaluées en utilisant le programme Mega 5.0.

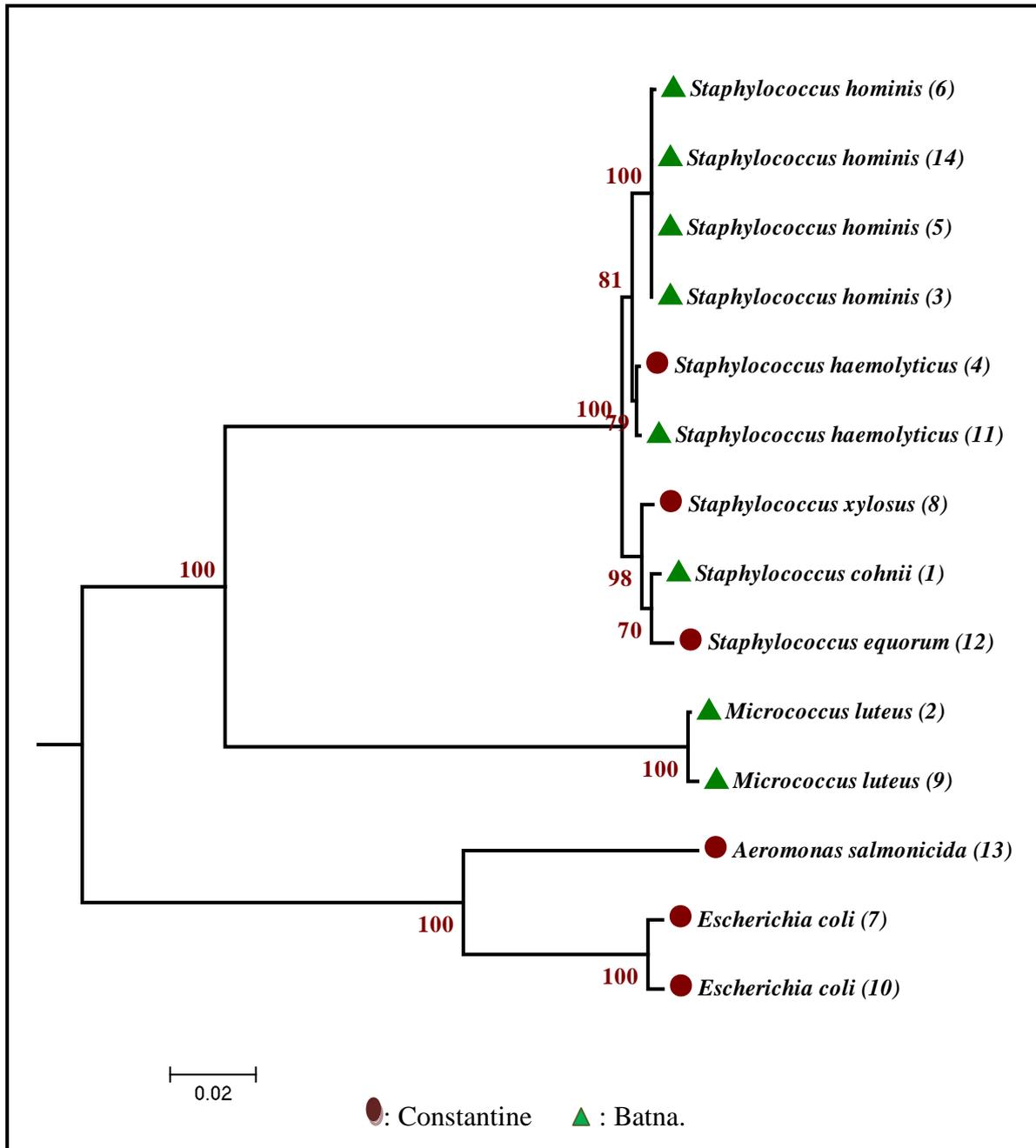


Figure 13: Arbre phylogénétique construit avec la méthode Neighbor-joining montrant les liens phylogénétiques entre les séquences basées sur les gènes d'ADNr 16S des isolats bactériens. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les valeurs de Bootstrap pour 1000 réplicats.

2.3.2. Amplification et séquençage du gène *rpoB*

Les amplifiats d'AND ont migré dans la région 1000 pb du gel d'agarose à 1,5 %. Une bande d'amplification unique a été obtenue pour tous les isolats (Fig. 14).

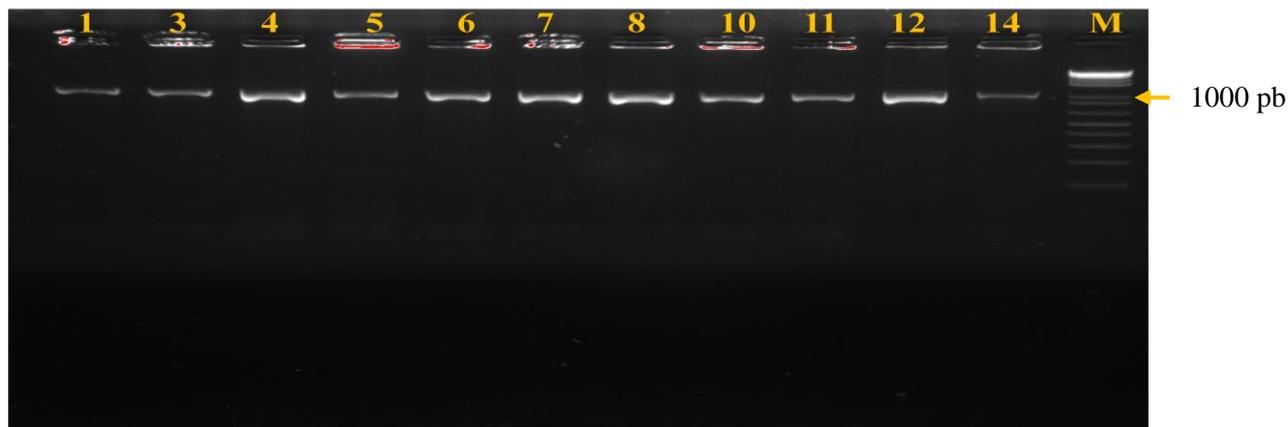


Figure 14: Résultats de la migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 % des produits d'amplification par PCR du gène *rpoB*

Les résultats d'identification par le programme bioinformatique BlastN sont présentés dans l'annexe C.

L'isolat C8 a été identifié comme *S. xylosus* (Accession No. [LN554884.1](#)) avec un pourcentage d'identité de 96,05 % et comme *S. saprophyticus* (Accession No. [AP008934.1](#)) avec 90,38 % d'identité.

Le BlastN de la séquence *rpoB* pour l'isolat C13 a montré qu'il partage une identité variable à l'intérieur du genre *Aeromonas* :

- 100 % avec *A. encheleia* (GenBank Accession No. [AY851136.1](#)),
- 99,61 % avec *A. salmonicida* (GenBank Accession No. [AY851099.1](#)),
- 98,45 % avec *A. popoffii* (GenBank No. [AY851138.1](#)) et
- 97,87 % avec *A. bestiarum* (GenBank Accession No. [AY851095.1](#)).

Par contre, son gène *gyrB* partage une identité de :

- 98,032 % avec *A. bestiarum* (GenBank Accession [AY987521.1](#)),
- 97,99 % avec *A. salmonicida* (GenBank Accession No. [CP000644.1](#)),
- 97,85 % avec *A. hydrophyla* (GenBank Accession No. [AF417624.1](#)) et
- 96,87 % avec *A. encheleia* (GenBank Accession No. [AF417635.1](#)).

Les séquences du gène *rpoB* obtenues ont été soumises dans la banque européenne EMBL sous les numéros d'accès mentionnés dans le tableau 9. L'alignement multiple de ces séquences est présenté dans l'annexe D.

Tableau 9: Codes EMBL des séquences du gène *rpoB*

Souches	Nom	N° d'accèsion	
		<i>rpoB</i>	
		Gène	Traduction
1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	LM651917	CDX05291.1
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Non fait (pour cause des amorces)	
3	<i>Staphylococcus hominis</i>	LM651918	CDX05292.1
4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	LM651919	CDX05293.1
5	<i>Staphylococcus hominis</i>	LM651920	CDX05294.1
6	<i>Staphylococcus hominis</i>	LM651921	CDX05295.1
7	<i>Escherichia coli</i>	LM651922	CDX05296.1
8	<i>Staphylococcus xylosus</i>	LM651923	CDX05296.1
9	<i>Micrococcus luteus</i>	Non fait (pour cause des amorces)	
10	<i>Escherichia coli</i>	LM651924	CDX05298.1
11	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	LM651925	CDX05299.1
12	<i>Staphylococcus equorum</i>	LM651926	CDX05300.1
13	<i>Aeromonas spp.</i>	A été soumise après finalisation de la thèse	
14	<i>Staphylococcus hominis</i>	LM651927	CDX05301.1

La diversité phylogénétique et la position taxonomique de ses isolats (Fig.15) ont été évaluées en utilisant le programme Mega 5.0.

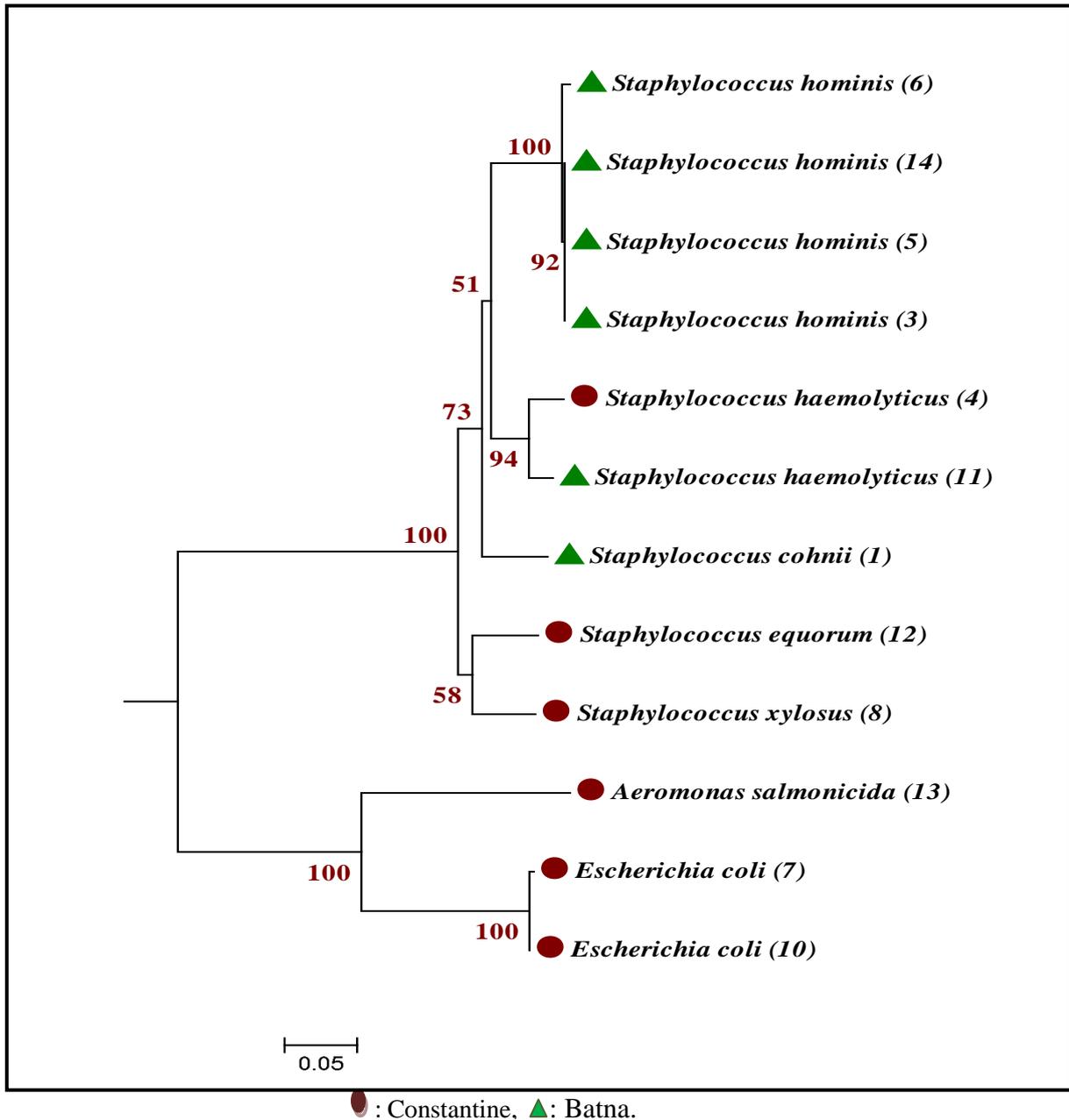


Figure 15: Arbre phylogénétique construit avec la méthode Neighbor-joining montrant les liens phylogénétiques entre les séquences *rpoB* des isolats bactériens. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les valeurs de Bootstrap (1000 répliqués)

2.3.3. Utilisation de la méthode MLST pour l'identification de l'isolat C13

Les différentes méthodes que nous avons utilisées n'ont pas permis une identification précise de l'isolat C13 jusqu'au niveau de l'espèce. Nous avons donc utilisé la méthode MLST avec les gènes *rpoB* et *gyrB* pour pouvoir trancher la position taxonomique de cet isolat. La figure 16 montre l'arbre phylogénétique sur les séquences concaténées des deux gènes de différentes espèces d'*Aeromonas*.

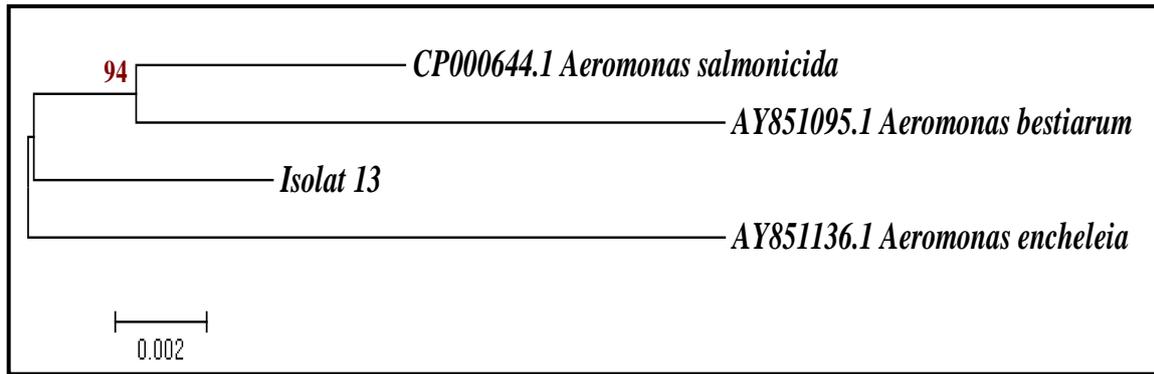
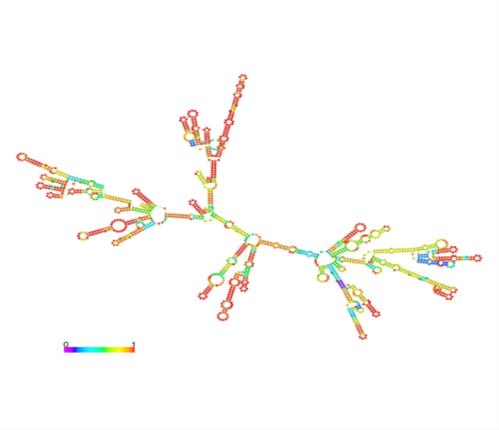
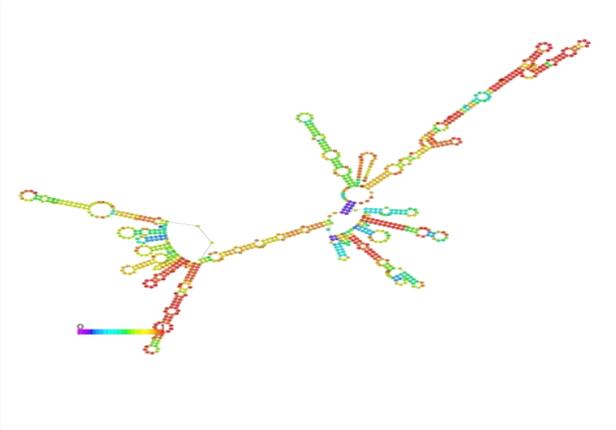
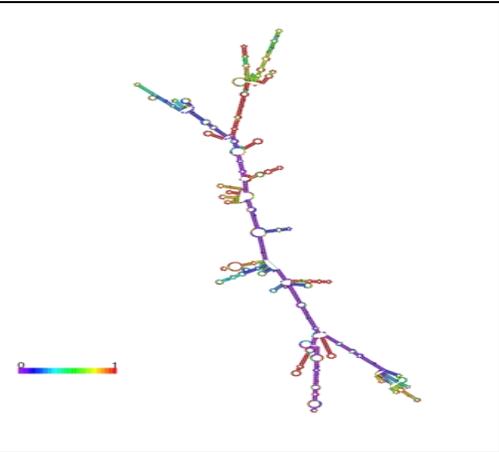


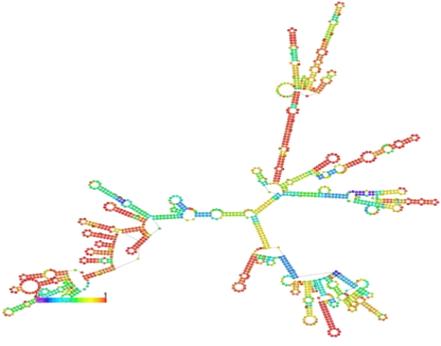
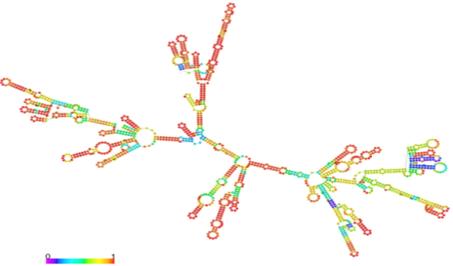
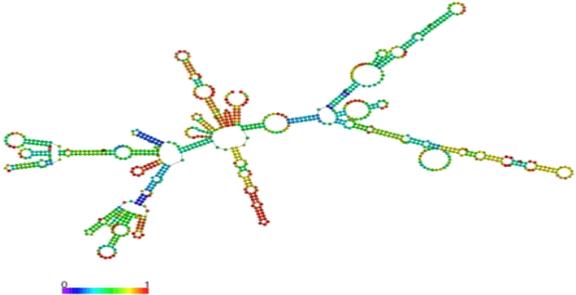
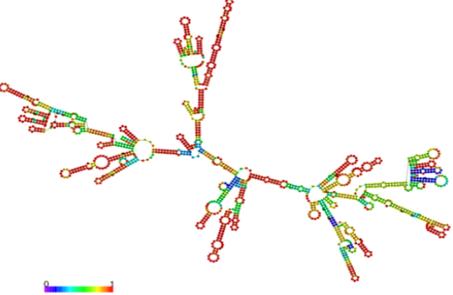
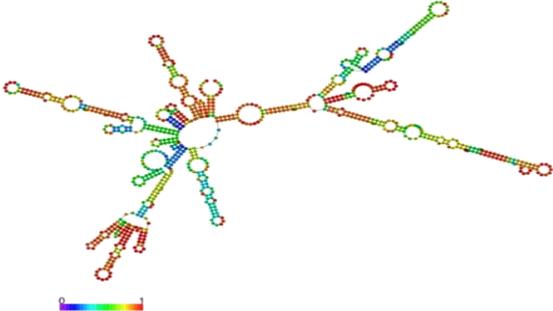
Figure 16 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode Neighbor-joining montrant les liens phylogénétiques entre les séquences concaténées des gènes *rpoB* (534 pb) et *gyrB* (1244pb) des espèces du genre *Aeromonas*

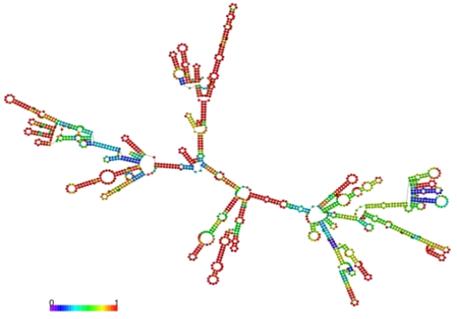
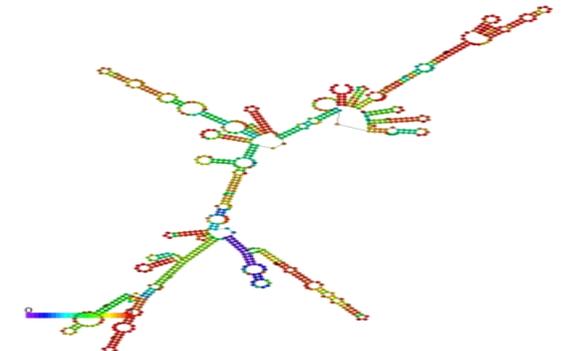
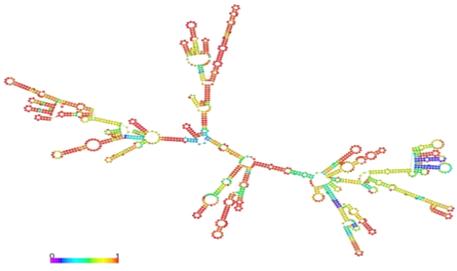
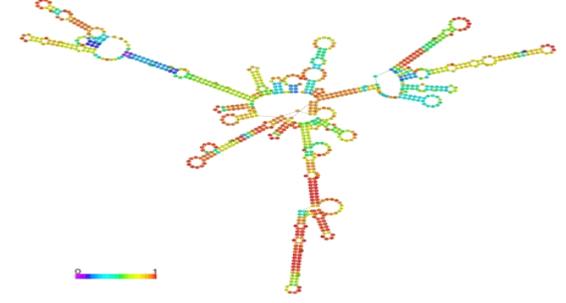
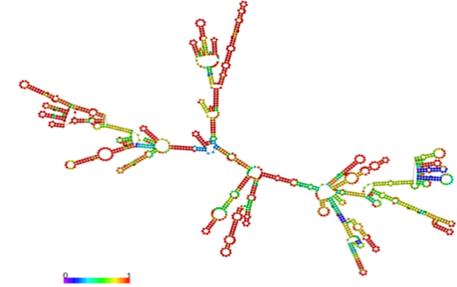
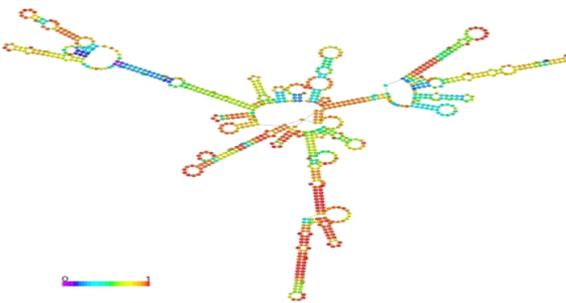
2.4. Analyses bioinformatiques

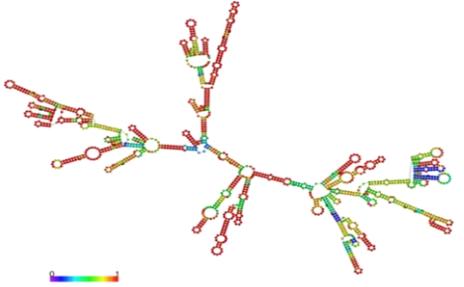
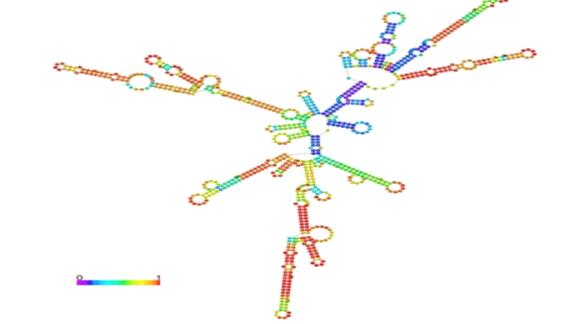
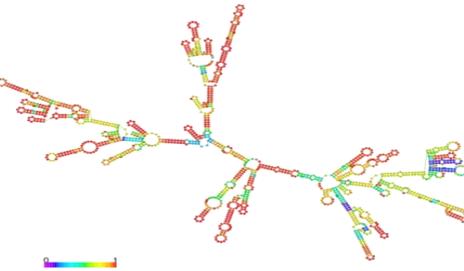
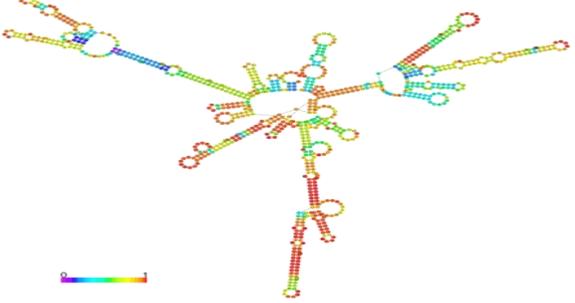
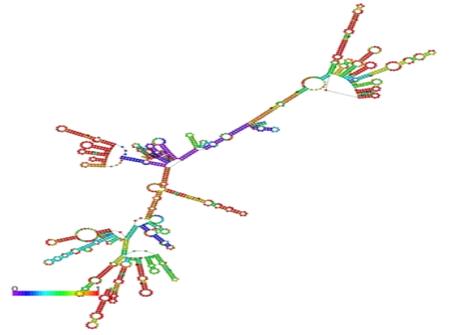
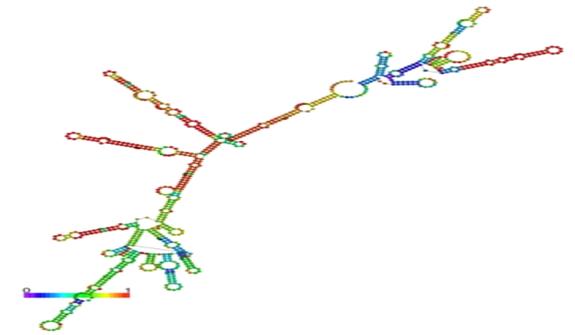
Les résultats des analyses bioinformatiques sont présentés dans les tableaux 10-14.

Tableau 10: Structures 2D des *ADNr 16S* et *rpoB* séquencés des différents isolats et leurs énergies libres ΔG°

Isolat	ADNr 16S			<i>rpoB</i>		
	Structure secondaire	Nbr pb	ΔG° kcal/mol	Structure secondaire	Nbr pb	ΔG° kcal/mol.
B1 <i>Staphylococcus</i> <i>cohnii</i>		1504	-540.91		866	-233.55
B2 <i>Micrococcus</i> <i>luteus</i>		1486	-596.14	Non fait		

<p>B9 <i>Micrococcus luteus</i></p>		<p>1486</p>	<p>-596.43</p>	<p>Non fait</p>		
<p>C4 <i>Staphylococcus haemolyticus</i></p>		<p>1502</p>	<p>-535.87</p>		<p>866</p>	<p>-226.19</p>
<p>B11 <i>Staphylococcus haemolyticus</i></p>		<p>1502</p>	<p>-534.32</p>		<p>866</p>	<p>-222.20</p>

<p>C8 <i>Staphylococcus xylosus</i></p>		<p>1504</p>	<p>-539.80</p>		<p>866</p>	<p>-238.04</p>
<p>B3 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>1502</p>	<p>-541.75</p>		<p>866</p>	<p>-225.87</p>
<p>B5 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>1502</p>	<p>-541.75</p>		<p>866</p>	<p>-225.87</p>

<p>B6 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>1502</p>	<p>-541.96</p>		<p>866</p>	<p>-232.18</p>
<p>B14 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>1502</p>	<p>-541.75</p>		<p>866</p>	<p>-225.87</p>
<p>C7 <i>Escherichia coli</i></p>		<p>1503</p>	<p>-587.36</p>		<p>879</p>	<p>-313.36</p>

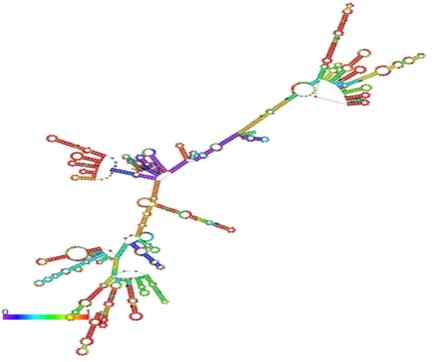
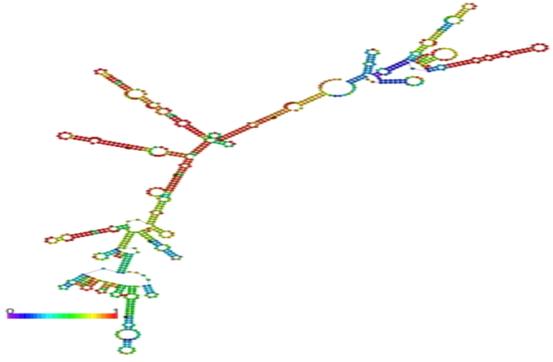
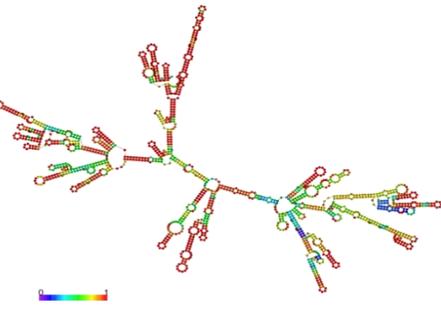
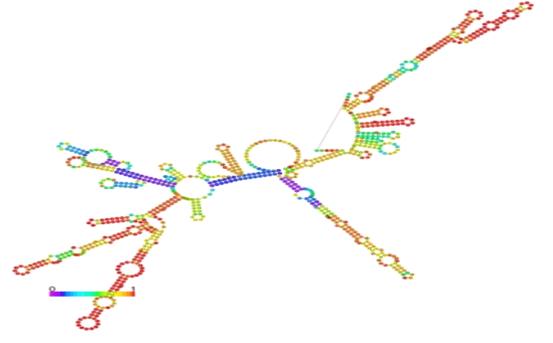
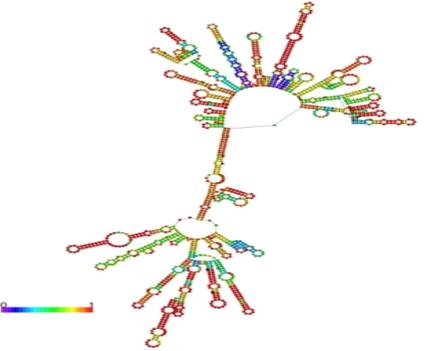
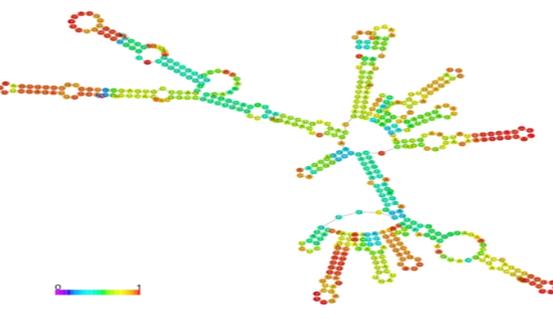
<p>C10 <i>Escherichia coli</i></p>		<p>1503</p>	<p>-589.60</p>		<p>879</p>	<p>-312.83</p>
<p>C12 <i>Staphylococcus equorum</i></p>		<p>1504</p>	<p>-536.67</p>		<p>866</p>	<p>-235.95</p>
<p>C13 <i>Aeromonas ssp</i></p>		<p>1508</p>	<p>-606.08</p>		<p>517</p>	<p>-176.38</p>

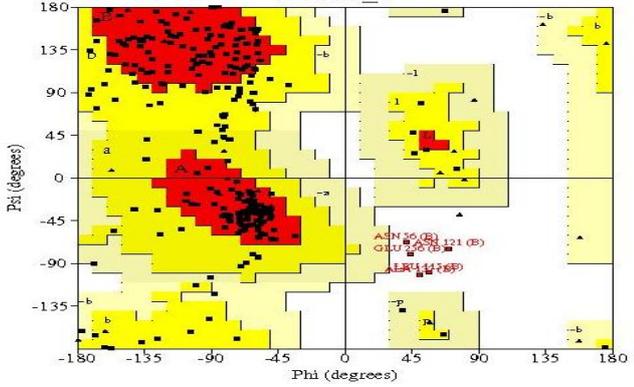
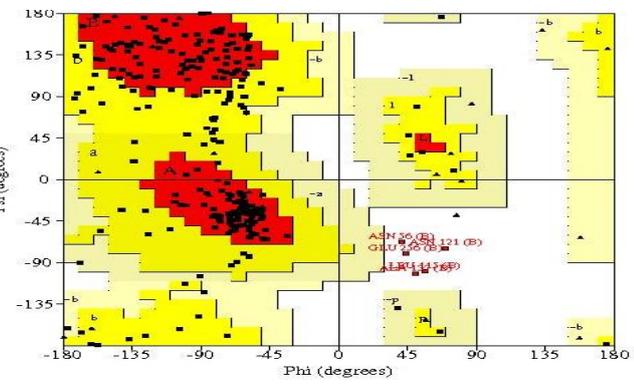
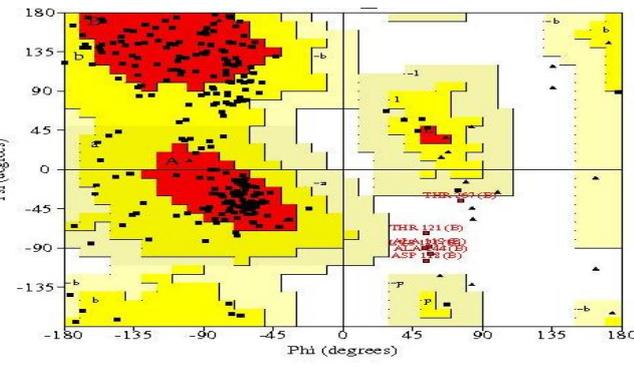
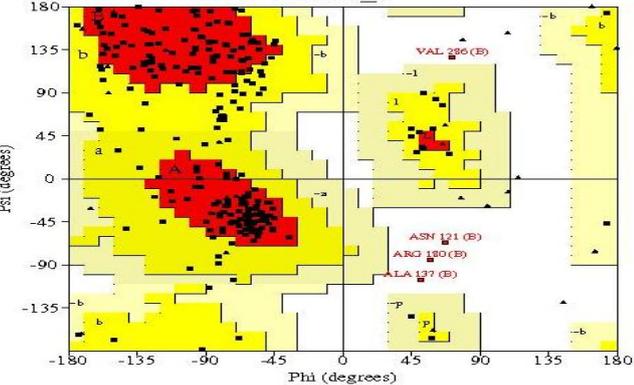
Tableau 11 : Résultats des séquences protéiques de la GAPDH contre BlastP

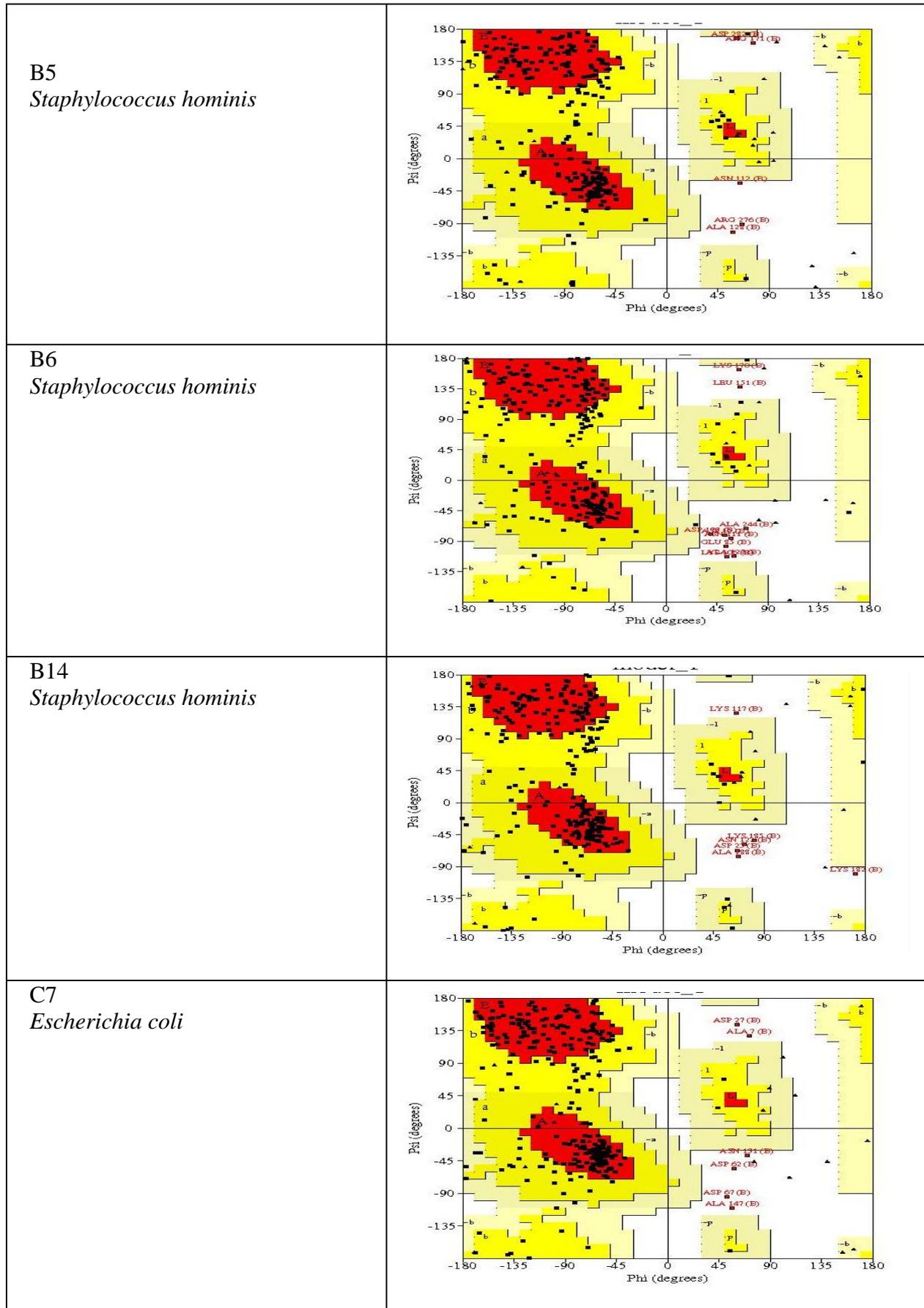
Echantillon	Séquences	Nombre AA	Nom du BLASTP	N° Genbank	Score	% Identité	E-value
B1 <i>Staphylococcus cohnii</i>	>B1 IGRLAFRRIQDVEGIDVVAVNDLTDDDEMLAHLKLYDTTQGRFTGEVE VEENGFRVNGLEVKSFSFPDPSKLPWGDLDIDVVLECTGLFTDKEKA EAHINAGAKKVLISAPAKGDLTKTIVYNTNHDTLDGSEDVVS GASCTT NSLAPVAKVLNDEFGLIEGFMTTIHAYTGDQSTQDAPHRKGDKRRAR AAAENIIPNSTGAAKAIGLVIPEIDGKLDGGAQRVPVATGSLTELTVV DKNVSIEDVNNAMKNASNESFGYTEDEIVSSDVIGMTYGS LFDATQT RVMTVGD	291	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Staphylococcus cohnii]	AFK29583.1	592	100%	0
B2 <i>Micrococcus luteus</i>	>B2 DRGHENLELVAVNDLADPEDLFWLTQYDTILGRYPGELERTEKGRFRIDG RDVAFFQEADPTKLPWGE LGVDLVIECTGIFTTGPKAQAHL DAGAKKV LISAPAKEVDGTFVMGVNEHTYDAETMHIVSNASCTTNCLAPMAKVLN DEFGIVDGMITTIHAYTGDQNLHDNVHKKDRRRARAAAQNMVPTSTG AAKAIGEVIPELKGKLDGFAMRVPTITGSATDLTVELTRHVEVEEINAAF KKAESGPLQGRLVYSEDPIVSSDIITSPAACFDAPLTKSIGQTVKIIGW	293	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Micrococcus luteus</i>]	WP_036338569.1	604	99.317	0
B3 <i>Staphylococcus hominis</i>	>B3 IGRLAFRRIQDVEGIEVVAVNDLTDDDEMLAHLKLYDTMQGRFNGDVE VVEGGFRVNGKEVKSFEPPDASKLPWGDLDIDVVLECTGFYTEKEKA EAHINAGAKKVLISAPAKGDVKTIVFNTN HKDL DGSETVVS GASCTT NSLAPVAKVLNDEFGLIEGLMTTIHAYTGDQMTQDGPHRKGDKRRA RAAAQNIVPNSTGAAKAIGKVIPEIDGKLDGGAQRVPVATGSLTEVTV VLEKEVTVEDV NKAMKNAADESFGYTEDEIVSSDIVGMNFGSLFDAT QTRVISVGDK	292	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus hominis</i>]	EEK13041.1	594	100%	0
C4 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	>C4 RRIQDVEGIEVVAVNDLTDDDEMLAHLKLYDTMQGRFTGEVEIDGGF RVNGKEVKS YEPPDASKLPWGDLDIDVVLECTGFYTDKEKAEAHINA GAKKVLISAPAKGDVKTIVFNTNHNLDL DGSETVVS GASCTTNSLAPV AKVLSDEFGLVEGLMTTIHAYTGDQMTQDGPHKKGDKRRARAAAQ NIVPNSTGAAKAIGKVIPEIDGKLDGGAQRVPVATGSLTEVTVVLEKD VTVEDV NKAMKNASNESFGYTEDEIVSSDVVGMTYGS LFDATQTRV MSVGDRQ	287	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435]	BAE05422.1	586	100%	0

B5 <i>Staphylococcus hominis</i>	>B5 RIQDVEGIEVVAVNDLTDDEMLAHLKDYDTMQGRFNGDVEVVEGGF RVNGKEVKSFEEDASKLPWGDLDIDVVLECTGFYTEKEKAEAHINA GAKKVLISAPAKGDVKTIVFNTNHKDLGSETVVS GASCTTNSLAPV AKVLNDEFGIVEGLMTTIHAYTGDQMTQDGP HRKGDKRRARAAAQ NIVPNSTGAAKAIGKVIPEIDGKLDGGAQRVPVATGSLTEVTVVLEKE VTVEDVNKAMKNAADESFGYTEDEIVSSDIVGMNFGSLFDATQTRVI SVGDKQ	286	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus hominis</i>]	EEK13041.1	582	100%	0
B6 <i>Staphylococcus hominis</i>	>B6 DVEGIEVVAVNDLTDDEMLAHLKDYDTMQGRFNGDVEVVEGGFRV NGKEVKSFEEDASKLPWGDLDIDVVLECTGFYTEKEKAEAHINAGA KKVLISAPAKGDVKTIVFNTNHKDLGSETVVS GASCTTNSLAPVAK VLNDEFGIVEGLMTTIHAYTGDQMTQDGP HKKGDKRRARAAAQ NIVPNSTGAAKAIGKVIPEIDGKLDGGAQRVPVATGSLTEVTVVLEKEVT EDVNKAMKNAADESFGYTEDEIVSSDVGMNFGSLFDATQTRVISVG DKQ	283	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus hominis</i>]	EEK13041.1	573	100%	0
C7 <i>Escherichia coli</i>	>C7 MSKVGINGFGRIGRLVLRRLLEVKSNIDVV AINDLTSPKILAYLLTHDS NYGPFPSVDFTEDSLIVDGKSIAYVAEKEAKNIPWKAKGAEIIVECT GFYTSAEKSAHL DAKKVLISAPAGEMKTIVYNNDDTL DGNDTI VSVASCTTNCLAPMAKALHDSFGIEVGTMTTIHAYTGTQSLVDGPRG KDLRASRAAAENIIPHTTGAAKAIGLVIPELSGKLGHAQRVPVKTGS VTELVSILGKKVTAEEVNNALKQATTNNESFGYTDEEIVSSDIIGSHFG SVFDATQTEITAVGDLQLVKTVAWYDNEYGFVTQLIRLTLEKFAKL	333	Full=Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase C; <i>Escherichia coli</i>	P58072.1	677	99.40%	0
C8 <i>Staphylococcus xylosus</i>	>C8 VDGIDVVAVNDLTDDEMLAHLKDYDTMQGRFTGEVEVENDGFRVNGQ EVKSFSEPEPSKLPWKDL DLDIDVVLECTGFFADKEKAEAHIEAGAKKVLIS APATGDLKTIVYNTNHQELDGSETVVS GASCTTNSLAPVAKVLNDDFG LVEGFMTTIHAYTGDQSTQDAPHRKGDKRRARAAAENIIPNSTGAAKAI GLVIPEIDGKLDGGAQRVPVATGSLTELTVVLEKNVSIEDVNASMKNAS NESFGYTEDEIVSSDIVGMYGSLFDAT	271	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus xylosus</i>]	WP_039068645.1	556	100%	0
B9 <i>Micrococcus luteus</i>	>B9 RDRGHEGLELVAVNDLADPEDLFWLTKYDTILGRYPGELERTEKGFRI DGS DVAFFQEADPTKLPWGELGVDLVI ECTGIFTTGPKAQHLDAGA KKVLISAPAKEVDGTFVMGVNEHTYDAETMHIISNASCTTNCLAPMA KVLNDEFGIVDGIMTTIHAYTGDQNLHDNVHKKDRRRARAAAQNMV PTSTGAAKAIGEVIPELKGLDGFAMRVPITITGSATDLTVELTRHVEV EEVNAAFKKAESGPLQGRVYSEDPVSSDIITSPAACFTFDA PLTKSIGQTVKVI G	293	type I glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase [<i>Micrococcus luteus</i>]	WP_036338569.1	599	98.635	0

<p>B11 <i>Staphylococcus haemolyticus</i></p>	<p>>B 11 RRIQDVEGIEVVAVNDLTDDEMLAHLKDYDTMQGRFTGEVEVVDGG FRVNGKEVKS YE E P D A S K L P W G D L D I D V V L E C T G F Y T D K E K A E A H I N A G A K K V L I S A P A K G D V K T I V F N T N H N D L D G S E T V V S G A S C T T N S L A P V A K V L S D E F G L V E G L M T T I H A Y T G D Q M T Q D G P H K K G D K R R A R A A A Q N I V P N S T G A A K A I G K V I P E I D G K L D G G A Q R V P V A T G S L T E V T V V L E K D V T V E D V N K A M K N A S N E S F G Y T E D E I V S S D V V G M T Y G S L F D A T Q T R V M S V G D R Q</p>	<p>287</p>	<p>glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i> JCSC1435]</p>	<p>EZI38298.1</p>	<p>585</p>	<p>100%</p>	<p>0</p>
<p>C12 <i>Staphylococcus equorum</i></p>	<p>>C12 RIQDVEGIDVVAVNDLTDDEMLAHLKDYDTTQGRFTGEVEVEKDGFR VNGQEVKSFSEPEPSKLPWKDL DIDV VLECTGFFADKEKAEAHIDAG AKKVLISAPATGDLKTIVYNTNHS ELDGSETV VSGASCTTNSLAPVAK VLNDDFGLVEGFMTTIHAYTGDQSTQDAPHRKGDKRRARAAAENIIP NSTGAAKAIGLVIPEIDGKLDGGAQRVPVATGSLTELT VVLEKDV SVE DVNAAMKNASDESFGYTEDEIVSSDVIGMTYGS LFDATQTRV RQLEIT N</p>	<p>286</p>	<p>glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus</i> <i>equorum</i>]</p>	<p>WP_046465088.1</p>	<p>569</p>	<p>99%</p>	<p>0</p>
<p>B14 <i>Staphylococcus hominis</i></p>	<p>>B14 RIGRLAFRRIQDVEGIEVVAVNDLTDDEMLAHLKDYDTMQGRFNGDV EVVEGGFRVNGKEVKSFE E P D A S K L P W G D L D I D V V L E C T G F Y T E K E K A E A H I N A G A K K V L I S A P A K G D V K T I V F N T N H K D L D G S E T V V S G A S C T T N S L A P V A K V L N D E F G I V E G L M T T I H A Y T G D Q M T Q D G P H R K G D K R R A R A A A Q N I V P N S T G A A K A I G K V I P E I D G K L D G G A Q R V P V A T G S L T E V T V V L E K E V T V E D V N K A M K N A A D E S F G Y T E D E I V S S D I V G M N F G S L F D A T Q T R V I S V G D K Q</p>	<p>294</p>	<p>glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase [<i>Staphylococcus</i> <i>hominis</i>]</p>	<p>EEK13041.1</p>	<p>599</p>	<p>100%</p>	<p>0</p>

Tableau 13: Diagrammes de Ramachandran de la GAPDH des différents isolats générés par Geno3D

Isolat	Diagramme de Ramachandran
<p>B1 <i>Staphylococcus cohnii</i></p>	 <p>ASN 80 (B) GLU 121 (B) ALA 137 (B)</p>
<p>B2 <i>Micrococcus luteus</i></p>	 <p>ASN 80 (B) GLU 121 (B) ALA 137 (B)</p>
<p>B9 <i>Micrococcus luteus</i></p>	 <p>THR 80 (B) THR 121 (B) MET 122 (B) ASP 136 (B)</p>
<p>B3 <i>Staphylococcus hominis</i></p>	 <p>VAL 280 (B) ASN 121 (B) ARG 130 (B) ALA 137 (B)</p>



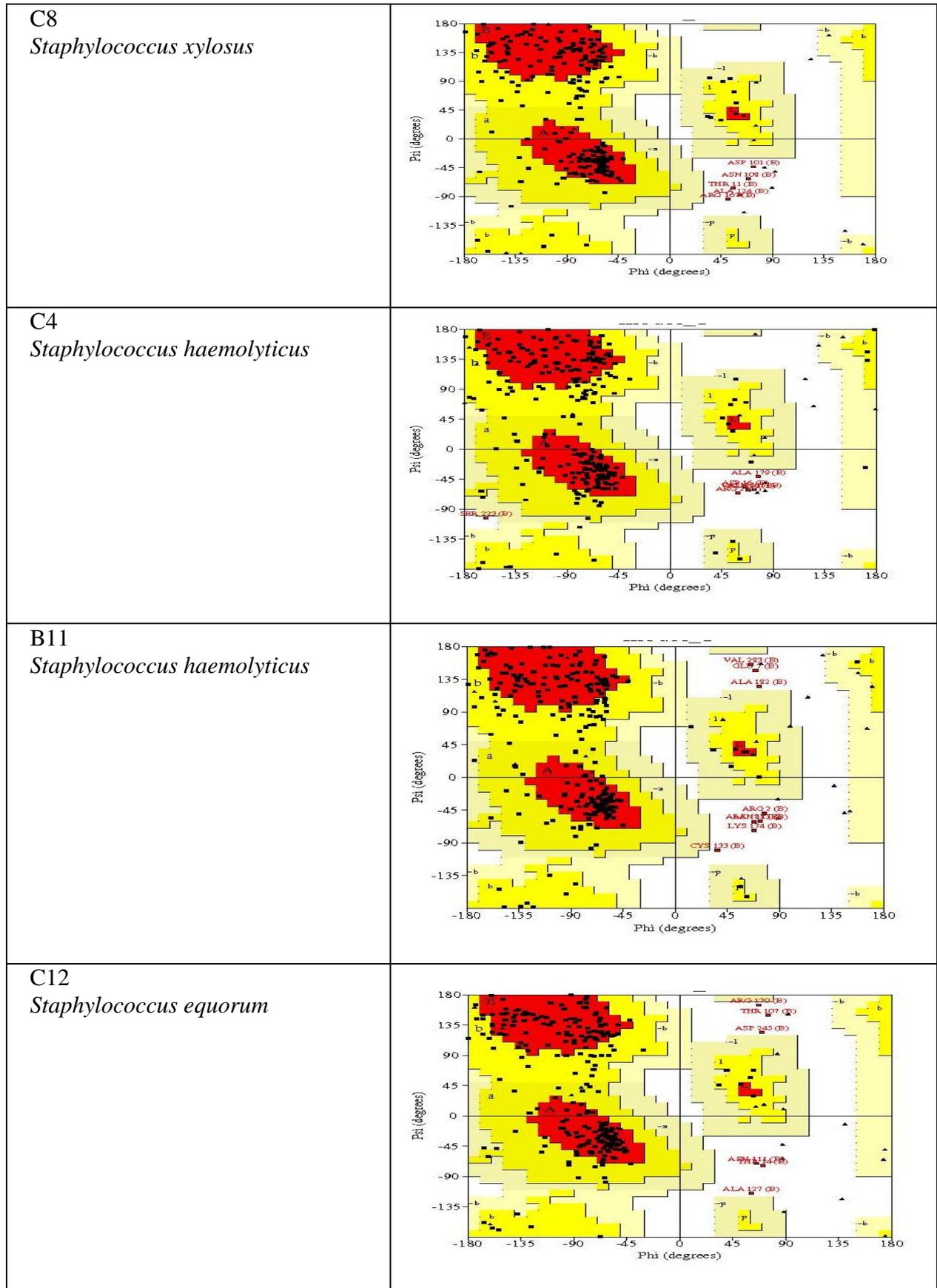
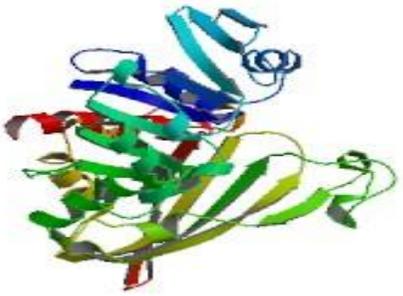
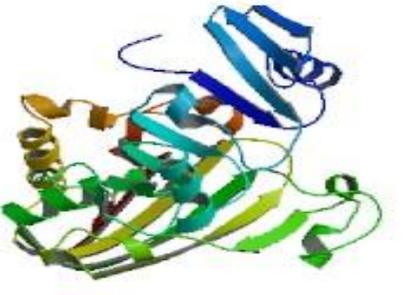
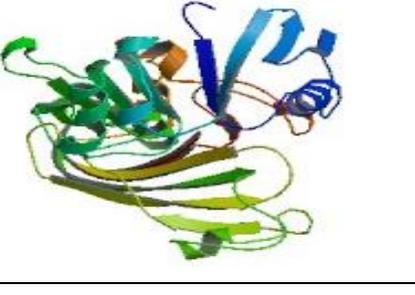
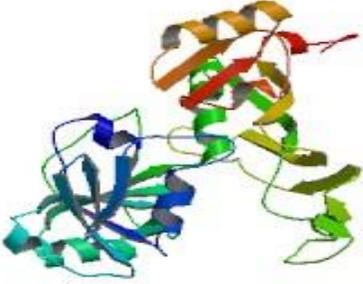
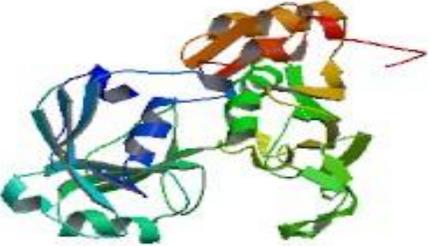
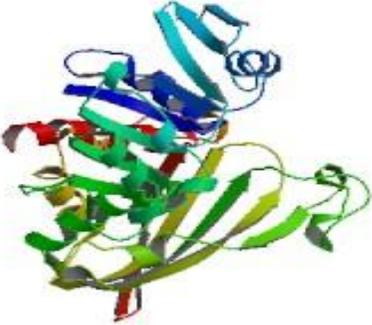
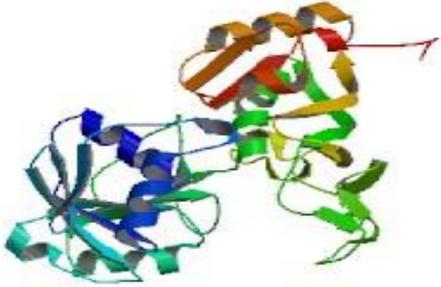
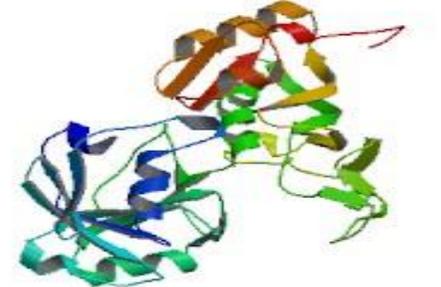
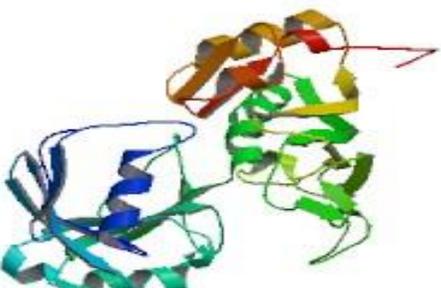
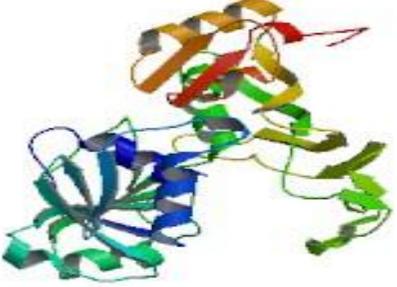
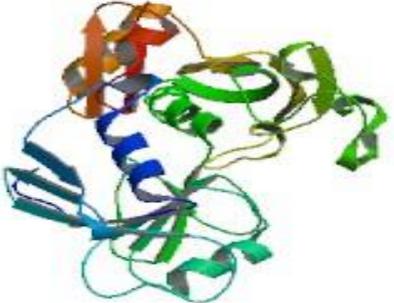
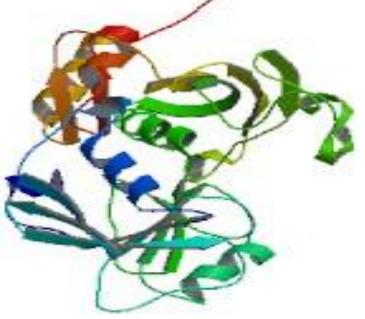


Tableau 14: Modèles 3D prédits *in silico* pour les différentes séquences de GAPDH générés par le programme Modeller

Isolat	Structure 3D	Taille de protéine	Segment modélisé	Taille	Identité Seq. (%)	Code PDB	Segment de la PDB
B1 <i>Staphylococcus coхни</i>		291	1-291	291	88.00	<u>3lvfP</u>	13-304
B2 <i>Micrococcus luteus</i>		293	3-293	291	55.00	<u>2ep7A</u>	23-319
B9 <i>Micrococcus luteus</i>		293	5-293	289	55.00	<u>3cmcO</u>	22-309

<p>C4 <i>Staphylococcus haemolyticus</i></p>		<p>287</p>	<p>1-287</p>	<p>287</p>	<p>91.00</p>	<p><u>3lvfP</u></p>	<p>19-306</p>
<p>B11 <i>Staphylococcus haemolyticus</i></p>		<p>287</p>	<p>1-287</p>	<p>287</p>	<p>92.00</p>	<p><u>3lvfP</u></p>	<p>19-306</p>
<p>C7 <i>Escherichia coli</i></p>		<p>333</p>	<p>1-333</p>	<p>333</p>	<p>58.00</p>	<p><u>3lvfP</u></p>	<p>2-334</p>

<p>B3 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>292</p>	<p>1-292</p>	<p>292</p>	<p>88.00</p>	<p><u>3lvfP</u></p>	<p>13-305</p>
<p>B5 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>286</p>	<p>1-286</p>	<p>286</p>	<p>88.00</p>	<p><u>3lvfP</u></p>	<p>20-306</p>
<p>B6 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>283</p>	<p>1-283</p>	<p>283</p>	<p>88.00</p>	<p><u>3lvfP</u></p>	<p>23-306</p>

<p>B14 <i>Staphylococcus hominis</i></p>		<p>294</p>	<p>1-294</p>	<p>294</p>	<p>88.00</p>	<p><u>3lvfP</u></p>	<p>12-306</p>
<p>C8 <i>Staphylococcus xylosus</i></p>		<p>271</p>	<p>1-271</p>	<p>271</p>	<p>90.00</p>	<p><u>3lc7P</u></p>	<p>24-295</p>
<p>C12 <i>Staphylococcus equorum</i></p>		<p>286</p>	<p>1-282</p>	<p>282</p>	<p>86.00</p>	<p><u>3lc7P</u></p>	<p>20-302</p>

3. DISCUSSION

En raison du caractère peu spécifique des signes cliniques et de la diversité des agents étiologiques responsables de mammites, l'isolement des bactéries lors d'infections, qu'elles soient d'évolution aiguë ou chroniques, souvent subcliniques, permet de guider la conduite thérapeutique. En effet, l'identification de la bactérie permet d'envisager un traitement plus efficace des mammites (Rakotozandrindrainy et Foucras 2007).

Dans ce travail, il ressort une large variété à SCN. En effet, parmi les 14 isolats, cinq espèces staphylococciques différentes ont été identifiées dans les deux wilayas (Batna et Constantine) :

- *S. cohnii* : 01 cas
- *S. hominis* : 04 cas
- *S. xylosus* : 01 cas
- *S. haemolyticus* : 02 cas
- *S. equorum* : 01 cas

Dans de nombreux pays, les SCN sont actuellement les microorganismes les plus fréquemment isolés chez les vaches (Tenhagen *et al.*, 2006; Abdel-rady, 2009; Hosseinzadeh *et Saei*, 2014; Sztachañska *et al.*, 2016). Ils sont considérés comme agents pathogènes émergents de la mammité bovine (Pyörälä et Taponen, 2009). L'isolement en grand nombre de SCN dans le lait, pose toujours le problème de leur imputabilité dans les mammites des vaches laitières. Néanmoins, plusieurs auteurs considèrent qu'ils interviennent dans les mammites subcliniques (Carbonnelle *et al.*, 2007; Van Veen, Claas, et Kuijper, 2010; Tomazi *et al.*, 2014). Dans les travaux de Piessence *et al.* (2011), l'on note une large distribution (dans le lait de vaches) des espèces *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* et *S. equorum* avec des taux respectifs de 3%, 27,6%, 3,7% et 1% respectivement.

Dans les diagnostics systématiques des mammites, les SCN ne sont pas identifiés au niveau des espèces mais traités comme un groupe uniforme (Pyörälä et Taponen, 2009), d'où l'avantage important du MALDI-TOF MS, qui reconnaît correctement les spectres de diverses espèces de SCN comme a été prouvé dans d'autres études (Carbonnelle *et al.*, 2007; Van Veen *et al.*, 2010; Tomazi *et al.*, 2014).

Un isolat (Isolat C8) a été identifié comme *S. xylosus* par MALDI TOF. Cependant le séquençage du gène ADNr 16S a identifié cet isolat comme étant *S. saprophyticus* (EU855210.1) avec 99,86 % d'identité et *S. xylosus* (LN554884.1) avec 99,73 % d'identité.

Le résultat de l'isolat C8 a été confirmé par le séquençage partiel du gène *rpoB*. C'est un *S. xylosus*. Ce gène, comme le gène codant pour l'ADNr 16S, est universel (Mollet *et al.*, 1997) et il représente une cible moléculaire utile pour différencier les isolats staphylococciques au niveau des espèces (Mellmann *et al.*, 2006). Drancourt *et al.* (2002) ont montré que l'utilisation de ce gène est une méthode rapide, objective et précise pour l'identification des espèces de staphylocoques. Heikens *et al.* (2005) ont trouvé que l'identification génotypique basée sur le séquençage de l'ADNr 16S a un pouvoir discriminant limité pour des espèces de *Staphylococcus* étroitement apparentées. De plus une comparaison, par paires, des séquences d'ADNr16S a montré des difficultés pour distinguer *S. saprophyticus* de *S. xylosus*.

Dans notre travail, la technique MALDI-TOF MS a identifié l'isolat C8 en tant que *S. xylosus* avec un score élevé de 2,063, montrant ainsi le pouvoir de cette méthode à différencier les espèces au sein de ce groupe. Des résultats similaires ont été trouvés dans l'étude de Tomazi *et al.* (2014) où le MALDI-TOFMS a identifié de manière correcte 103 isolats de SCN parmi 108 (Soit 95,4 %) isolés des vaches laitières atteinte de mammites dans l'État de Sao Paulo, au Brésil. Nos résultats sont également concordants avec les études effectuées sur des isolats staphylococciques humains : Spanu *et al.* (2011) ont évalué l'utilisation de MALDI-TOF pour l'identification de 450 isolats staphylococciques provenant des infections sanguines, et seulement trois isolats ont été mal identifiés en comparaison avec le méthode de séquençage utilisant le gène *rpoB*. Dupont *et al.* (2010) ont obtenu une identification correcte par MALDI-TOF dans 97,3 % (218 /224) des isolats de SCN provenant d'échantillons cliniques.

Pour le reste des isolats, deux ont été identifiés en tant que *Escherichia coli*. Cette bactérie fait partie des germes dits d'environnement car ils sont abondants sur tous les supports des étables, mais aussi dans l'eau. Comme l'ensemble des coliformes, cette bactérie est responsable d'infections parmi les plus sévères avec modification physique du lait, et réduction de la production et même de choc toxique aboutissant à la déshydratation et à la mort. Le climat, plus humide dans certaines régions, pourrait être un facteur favorisant (Nous avons isolé deux souches à Constantine et aucune à Batna). Quand la mamelle est au contact avec l'eau, souvent contaminée par des coliformes, et ce pendant plusieurs heures par jour, cela facilitera la contamination de la glande mammaire (Rakotozandrindrainy et Foucras, 2007). Dans les travaux de Asnoue *et al.* (2012) effectués dans cinq Wilayas Algériennes, à savoir El Tarf, Annaba, Skikda, Guelma et Souk haras, *E. coli* a été isolée dans 14,5% des cas

sur un total de 235 échantillons. Les auteurs ajoutent dans leur commentaire que cette large distribution serait le résultat d'une mauvaise hygiène de la stabulation et des vaches. Au Canada (Montréal), dans les travaux de Klaas et Zadoks (2017), *E. coli* est le germe majeur dans les mammites subcliniques accompagné de *S. uberis*.

Cette espèce a été bien identifiée par MALDI-TOF MS en comparaison avec les différentes méthodes utilisées dans notre étude. Ce résultat est compatible avec celui de Randall *et al.* (2015) qui ont évalué le MALDI-TOF pour l'identification des isolats bactériens vétérinaire au Royaume-Uni provenant principalement de sources aviaires, bovines, ovines et porcines. Les 26 *E. coli* testées ont été identifiées avec le MALDI-TOF MS sans aucune ambiguïté.

L'espèce *Micrococcus luteus* est isolée deux fois uniquement dans la wilaya de Batna. Elle est considérée comme une flore de trayons normale avec une pathogénicité mineure (Radostits *et al.*, 2000), comme cela a été observé par Mekbib *et al.* (2010) au centre de l'Éthiopie.

L'isolat C13 a été identifié dans notre étude comme étant *Aeromonas ssp.* Youssef et Mohamed (2015) rapportent que cette bactérie ne cause pas de mammite, mais contamine généralement le lait pendant la traite non hygiénique (La mauvaise manipulation et les mauvaises conditions de stockage). L'espèce *A. Hydrophyla* a longtemps été considérée comme un agent pathogène isolé uniquement de l'environnement : eaux polluées et sol (Handfield, Simard et Letarte, 1996) et des aliments (Callister et Agger, 1987). Bizani et Brandelli (2001) rapportent que *A. hydrophila* pourrait être impliqué dans les affections digestives, les septicémies, les méningites, les péricardites, les infections urinaires mais surtout les infections respiratoires.

L'analyse des séquences du gène de l'ADNr 16S, dans le cas du genre *Aeromonas*, indique que celui-ci est composé d'un groupe très étroit d'espèces dont certaines ne se différencient que de quelques nucléotides. Par exemple, *A. salmonicida* et *A. bestiarum* sont difficiles à distinguer car elles ne diffèrent que par deux positions de nucléotides sur toute la séquence du gène de l'ADNr 16S (Küpfer *et al.*, 2006). Dans notre cas, nous avons noté une différence de cinq nucléotides au moins entre notre séquence (1508 pb) et celles proposées par le BlastN. Récemment, de nombreux travaux ont montré que le MALDI-TOF MS est un bon outil d'identification d'*Aeromonas* au niveau de l'espèce (Benagli *et al.*, 2012; Lamy, Kodjo et Laurent, 2017). Cependant, dans notre étude, le MALDI-TOF MS a proposé

différentes espèces du genre *Aeromonas* avec de bons scores (>2). Ce résultat est en concordance avec l'étude de Shin *et al.* (2015) qui ont montré que la précision de MALDI-TOF MS dans la détection d'*Aeromonas* au niveau de l'espèce n'était pas parfaite pour certains isolats. En effet, lorsque deux espèces sont identiques au niveau génomique, l'expression de leur protéomes l'est aussi.

Ainsi, d'un point génotypique, des travaux antérieurs (Yáñez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004) ont montré que les séquences *gyrB* et *rpoB* ont été un outil puissant pour différencier les espèces d'*Aeromonas* et clarifier la taxonomie et les relations phylogénétiques entre les espèces de ce genre. Dans ce travail l'utilisation de ces deux gènes concaténés n'a pas permis d'identifier cet isolat jusqu'à l'espèce. Pour proposer à ce stade l'appellation *Aeromonas spp.*

Les résultats de notre étude sont compatibles avec les données récentes (Barreiro *et al.*, 2010 ; Couto *et al.*, 2014; El Behiry *et al.*, 2014; Schabauer *et al.*, 2014; Tomazi *et al.*, 2014) qui ont démontré que le MALDI-TOF-MS, en comparaison avec les méthodes moléculaires basées sur le séquençage de l'ADN, est une méthode puissante pour l'identification des bactéries isolées du lait des vaches atteintes de mammites subcliniques avec une spécificité et une sensibilité élevées.

La comparaison entre les méthodes génotypiques et le MALDI-TOF MS nous a amené aux conclusions suivantes :

- Rapide : l'identification, est de l'ordre de quelques minutes.
- Simple : un faible inoculum bactérien suffit.
- Précis : l'identification est fiable et reproductible. Il faut cependant souligner que les performances de la technologie MALDI-TOF varient en fonction des espèces (Seng *et al.*, 2009 ; Blondiaux, Gaillot et Courcol, 2010). Les insuffisances des bases de données sont souvent mises en cause (Seng *et al.*, 2009).
- Le faible coût par analyse en termes de consommables.
- Dans l'industrie laitière, le MALDI-TOF MS peut fournir une identification plus rapide, moins chère et plus fiable des microorganismes pour un contrôle de qualité microbiologique complet du lait.

Dans cette partie, en plus du MALDI-TOF MS et l'identification génotypique, nous avons fait la prédiction des structures secondaires des ARN 16s et *rpoB*, ainsi que les structures secondaires et tertiaires des séquences protéiques de la protéine GAPDH des différents isolats.

En effet, la connaissance de la structure secondaire 2D des ARNs aide à comprendre la fonction biologique dans laquelle sont impliqués ceux-ci. De plus, elle contribue considérablement à la confirmation de la place systématique et phylogénétique de l'isolat au sein de la communauté bactérienne, car on admet que les ARNs dont la fonction moléculaire est similaire doivent avoir des structures secondaires voisines (Allali, 2005 ; Tahi, 2014). Singh et Somvanshi (2008) ajoutent même que la structure secondaire de l'ARNr peut fournir de nouvelles perspectives pour comprendre l'évolution et la stabilité des espèces bactériennes.

Dans leur étude, Lusvardi *et al.* (2013) ont montré que les structures d'ARN à deux dimensions sont plus précises lorsqu'elles sont obtenues par la prédiction *in silico* que par la prédiction par la seule approche d'analyse par haut débit. Cette structure 2D qui est due à un repliement modulaire et hiérarchisé (i : liaisons Hydrogène entre bases et ii : empilement des bases) aboutissant à une architecture précise et spécifique voire plus importante que le repliement 2D des protéines du point de vue informationnel car elle comporte quatre types de monomères (AUGC) et six angles de torsion du squelette d'ARN alors que les protéines n'en comportent que deux : phi et psi (Lecouste-Philipps, 2006).

La description des agencements hélicoïdaux compatibles avec nos structures secondaires a permis de mettre en évidence les différences au niveau de la topologie candidate 2D des différents isolats. A ce stade, notons que toutes nos structures 2D prédites pour le cas du 16S DNA ne comportent aucun motif structural du type G-quadruplexe ; ce qui confirme que toutes les structures primaires analysées ne sont pas riches en Guanine (Lorenz R., 2013).

Nous constatons que les isolats de même espèce ont montré une topologie 2D comparable et voisine. Ainsi, le groupe d'isolats *S. hominis* (B3, B5, B6 et B14) ont montré une énergie libre très voisine de -541 Kcal/mol. Cette topologie structurale a été également observée par prédiction avec le logiciel Rfam par les travaux de Skrodenyte-Arbaciauskiene V. (2016) référencié sous le numéro de code JQ795921 dans la base de données EMBL (ENA).

Pour le cas des deux isolats C7 et C10, identifiés par blasting en tant que *E. coli*, leurs deux structures 2D sont identiques, voire superposables, avec un court écart énergétique ΔG° de 2,24 Kcal/mol. Cette identité topologique au sein des *E. coli spp.* a également été observée par Branlant *et al.* (1981) lorsqu'ils ont séquencé *E. coli* MRE 600. De plus, Ehresmann *et al.* ont rapporté dans leurs travaux, que l'hétérogénéité des séquences primaires nucléotidiques affectent les caractéristiques des structures secondaires du gène 16S ; or nos deux isolats ont

exprimé une forte identité entre leurs séquences primaires. Maly et Brimacombe (1983), en travaillant sur des séquences 16S et 23S, avec un total de 50 000 nucléotides, ont prédit les modèles affinés des structures 2D des deux gènes et ont conclu une attention particulière à la résolution des différences entre les différentes structures secondaires publiées pour ces molécules dans lesquelles ils ont observé 45 régions hélicoïdales dans les différentes topologies 2D de la molécule du 16S. Ils ajoutent également, que l'appariement de bases proposé par les prédictions de ces régions est encore ouvert à la discussion ; ce qui confirme encore une fois que les algorithmes n'arrivent à prédire que 80 % (Juan et Wilson, 1999) tout au plus de la structure 2D des gènes ; d'où les différences observées dans certains cas de prédiction entre les différents chercheurs. Mais Low et Weeks (2010) affirment de leur côté que les précisions de prédiction sur les structures 2D des ADNr atteignent $\geq 95\%$ avec l'avènement des algorithmes de programmation dynamique. Cependant, il faut bien mentionner que ces différences prédictives ne sont pas du tout significatives surtout que des précisions ont été apportées à l'échelle d'une ou deux nucléotides.

Les structures 2D des deux isolats B2 et B9 de *Micrococcus luteus*, sont différentes et ont des ΔG° -593,04 et -596,85 Kcal/mol respectivement (soit une différence de 3,81Kcal/mol). Nos deux isolats ont exprimé deux mutations au niveau de leurs séquences primaires, l'hétérogénéité des séquences primaires nucléotidiques affectent les caractéristiques des structures secondaires du gène 16S (Ehresmann *et al.* 1975).

Le seul isolat C8, *S. xylosus*, a montré une structure 2D avec une énergie libre de -539,80 Kcal/mol. Notre prédiction 2D est corroborée par une structure 2D identique prédite par le programme RNAfold ($\Delta G^\circ = -528,27$ Kcal/mol) à partir de la séquence primaire 16S rRNA dans les travaux de Takahashi *et al.* (1997). Des travaux sur la même espèce (Won, 2002) révèlent l'importance de la topologie 2D du gène 16S dans l'identification de cette bactérie. En effet, les régions 23S et le kit API STAPH n'ont pas identifié à eux seuls cet isolat.

S. equorum, isolat C12, a révélé une topologie 2D identique à celle prédite à partir de la séquence primaire de la souche AT2RP19 identifiée sur GenBank avec le numéro d'accès LT797519.1 ; avec une énergie libre $\Delta G^\circ = -512,21$ Kcal/mol. Cette similarité confirme notre résultat de prédiction.

La structure secondaire de l'isolat B1, *S. cohnii*, comparée à celle de GenBank (HE962229.1) a montré beaucoup de similarités mais des différences topologiques ont été

observées qui seraient dues principalement à la différence entre les deux tailles des deux isolats (notre isolat = 1504 pb et HE962229.1 = 948 pb).

L'isolat C13, *Aeromonas spp*, a permis de prédire une structure 2D avec une énergie libre $\Delta G^\circ = -606,08$ Kcal/mol. La comparaison 2D de notre topologie avec celle prédite avec le programme RNAfold, à partir de la séquence de *Aeromonas salmonicida* (GenBank AB027543.1 ; 1467 pb ; soumission en Octobre 2014) a montré une similarité 2D sur large surface des deux topologies à l'exception de quelques tiges et boucles observées sur notre séquences mais absentes sur la référence de GenBank. Nous pouvons considérer que cette différence serait due à la différence des longueurs de séquences ; d'où la perte de certains motifs structuraux dans la structure 2D correspondante.

L'approche d'analyse des structures secondaires du gène *rpoB* des différents isolats s'est basée sur la reconnaissance de motifs structuraux spécifiques des structures 2D des ARN codants. Ces motifs sont principalement représentés par des courtes séquences au niveau de la séquence de l'ARN. Parmi ces motifs, les tétraboucles (Tetraloops : boucles à quatre nucléotides). Celles-ci peuvent avoir différentes structures patterns (Leontis, Stombaugh, et Westhof, 2002) :

Le profil GNRA : avec N = A, C, G ou T et R, une base purique (soit A soit G). L'écriture de ce motif peut se faire de la manière suivante : G-[ACGT]-[AG]-A. Ce motif s'écrit donc avec huit (4x2) séquences différentes qui sont :

GAA GGA

GCA GCGA

GGA GGGA

GTA GTGA

Certains de ces motifs ont été retrouvés chez un isolat ou chez plusieurs en même temps. Par exemple, le motif GAAA a été retrouvé chez les isolats B3, B5, C7, C8 et C10 ; mais il n'a pas fait partie d'aucune tétraboucle chez tous ces isolats. Le motif GGGA a été observé chez l'isolat B3 et n'a pas contribué à la formation d'une tétraboucle également.

De manière générale, le motif de tétraboucle GNRA est absent de nos structures 2D, sachant qu'elles ont été prédites sur 250 pb uniquement avec les paramètres de réglages du programme utilisé en ligne (RNAstructure) qui ne permettaient pas de soumettre des séquences de grandes tailles pour la prédiction et la comparaison 2D de plusieurs isolats.

Le motif TNCG (ou : T-[ACGT]-C-G) peut s'écrire selon quatre possibilités qui sont : TACG, TCCG, TGCG et TTCG.

Les trois motifs TACG, TCCG et TGCG n'ont pas été retrouvés dans nos séquences *rpoB*. Seul, le motif TTCG a été retrouvé chez les isolats : B6 (181-184), B11 (81-84), B14 (206-209), C4 (54-57), C7 (84-87), C8 (32-35) et C10 (27-30). Chez les isolats C4 et B11 par exemple, ce motif (TTCG) fait partie d'une boucle à six résidus et non une tétraboucle.

De manière générale, la structure globale prédite de tous nos isolats laisse confirmer une analogie très proche pour les séquences *rpoB* des mêmes espèces surtout lorsque les séquences sont assez longues et assez similaires. Dans notre analyse, il ne nous était pas possible de séquencer la totalité du gène mais juste des séquences partielles à cause des amorces disponibles qui ne couvraient pas la majeure partie du gène d'intérêt ; mais l'outil 2D reste une puissante machine de comparaison des espèces à notre avis.

Les structures secondaires de la GAPDH ont toutes montré les principaux éléments qui entrent dans les conformations d'une structure 2D. En effet, nous avons observé des structures en hélice α , des feuilletts plissés en forme β et des coudes (appelés aussi Boucles ou Tours). Chacune de ces structures a été observée avec des fréquences spécifiques. En effet, nous avons noté une distribution des formes α comprise entre 22,88% (isolat C8 : *S. xylosus*) et 30,03% (isolat C7 : *E. coli*). Les formes β ont été distribuées dans un intervalle allant de 20,14% (isolat B9 : *M. luteus*) à 27,15% (isolat B1 : *S. cohnii*). En fin, le profil des coudes a été observé avec les plus grandes distributions comparativement aux formes α et β : de 48,05% (isolat C7 : *E. coli*) à 53,14% (isolat C8 : *S. xylosus*). Notons que ses distributions sont en accord avec les valeurs observées par De Breven (2004) où il note que les formes en hélice α contribuent dans les structures protéiques 2D avec une fréquence 28% - 35%, les formes β : 18% - 26% et les coudes : 40% - 50%.

La recherche, par alignement multiple au sein de toutes les séquences GAPDH des différents isolats, du motif représentatif contenant l'acide nucléophile du site actif de cette enzyme a également révélé la présence de cette empreinte moléculaire au sein de toutes nos

séquences. Ce motif a pour structure primaire : A-S-C-T-T-N-C-L chez le groupe *Micrococcus/Escherichia* et A-S-C-T-T-N-S-L chez le reste des isolats. L'écriture d'une séquence consensus de ce motif est alors, selon le format de la base de données UniProt : A-S-C-T-T-N-[SC]-L.

Nous constatons l'existence d'une mutation au niveau du 7^{ème} résidu aminoacide pour le quel le résidu Cystéine (résidu soufré : -CH₂ -SH) du groupe *Micrococcus/Escherichia* et remplacé par le résidu Sérine (résidu alcool : -CH₂- OH) chez le reste des isolats. Cette mutation est qualifiée d'acceptable car il y a une probabilité de 11% pour que cette substitution ait lieu entre ces deux résidus qui ont par ailleurs des structures et des propriétés similaires ne différant que par un seul atome (Dayhoff, 1976). La sérine et la cystéine ne diffèrent que par l'échange d'un atome de soufre avec un oxygène. Ainsi, la chaîne reste de la même taille et conserve ses propriétés hydrophiles, tout en ne perdant que son activité redox qui n'entre pas dans la catalyse enzymatique, car c'est plutôt la Cystéine en 3^{ème} position qui entre avec le NAD⁺ dans les mécanismes de la catalyse rédox de cette enzyme (Voet et Voet, 2011). Cette mutation n'affecte donc en rien la fonction de notre enzyme. De plus, Santos *et al.*, (2007) ont noté que la substitution de Sérine par la Cystéine n'illustre aucun impact important et que ces changements structuraux étaient conservateurs de la fonction de l'enzyme β -lactamase sur laquelle ils ont travaillé. Cette mutation par substitution serait donc le résultat d'une évolution moléculaire des différents microorganismes en vue d'une adaptation environnementale.

Notons également que ce motif est présent chez plusieurs individus microbiens. Le motif avec Cystéine en 7^{ème} position est observé chez : *Streptococcus equisimilis* (Q59906), *S. pyogenes* sérotype M1 (P0C0G7), *Treponema pallidum* (Q83816) et *Pichia ciferrii* (Q9UVCO). Le motif à Sérine peut être observé chez *Staphylococcus aureus* (Q5HHP5), *S. epidermidis* (Q5HQV5) et *Thermus aquaticus* (POO361).

Les structures tertiaires de la GAPDH ont été prédites à partir de séquences primaires de taille supérieure à 200 résidus ; ce qui leur permettrait de se replier en deux blocs au moins (Voet et Voet 2011) : ce sont les domaines protéiques. Nos prédictions des formes 3D de la GAPDH ont révélé l'existence de tels domaines.

L'alignement de la structure 3D de l'isolat B1 (*S. cohnii*) contre un modèle (c51d5C) de la PDB (Programme Phyre2) a rendu un résultat de 63% d'identité structurale 3D avec 100% de confiance. Les deux domaines sont distincts. Le domaine d'interaction avec NAD⁺

se situe entre les résidus 1- 139. Le domaine catalytique concerne les résidus 144 – 246. Le résidu 139 étant la Cystéine, responsable de l'activité catalytique de l'enzyme GAPDH. Cette position correspond bien avec celle de l'enzyme GAPDH isolée de *S. cohnii subsp. cohnii* (UniProtKB : A0A0F5X9R0).

L'isolat B2 (*Micrococcus luteus*) a révélé deux domaines distincts dans sa structure tertiaire. Le premier domaine se situe entre les résidus 2 – 153. Le résidu catalytique de la Cystéine est en position 133. La confrontation avec le modèle c5ld5C (programme Phyre2) a donné 54% d'identité, avec une confiance testée à 100%. Cette structure est également similaire à celle rapportée par Gan *et al.* (2014) et Hanafy *et al.* (2016).

La confrontation de la structure 3D de l'isolat C7 (*E. coli*) avec la modèle moléculaire *E. coli* O157 :H7 de UniProtKB a révélé une Cystéine catalytique en position 150 qui partie de premier domaine (2 – 150). Les résidus impliqués dans l'interaction avec NAD⁺ sont K78 et S120. Notre structure 3D est identique à celle du modèle de UniProtKB avec une fraction de 57% pour une confiance calculée de 100%.

En somme, les comparaisons des structures 3D, couteuses en terme de temps de calculs ont permis de révéler des positions du résidu majeur entrant dans la catalyse (Résidu Cys) dans différentes positions chez trois genres différents :

- *Micrococcus* (représenté par l'isolat B2) : C133
- *Staphylococcus* (représenté par l'isolat B1) : C139
- *Escherichia* (représenté par l'isolat C7) : C150

Cependant, nous notons que le motif auquel appartient ce résidu de cystéine est encadré dans un motif consensus commun chez tous les isolats ; ce qui a déjà été démontré lors de l'analyse des structures secondaires de la GAPDH. La contribution de ce résidu dans la catalyse a également été notée par Seidler (2013) lequel confirme l'implication de la cystéine par le groupement actif sulfhydryle (-S⁻) en position 149.

Chapitre II :

Atténuation de la virulence
de *P. aeruginosa* par
quorum quenching

1. INTRODUCTION

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence (membranaires et extracellulaires) agissant à différents niveaux au cours de l'infection, lui permettant de survivre aussi bien dans différents hôtes que dans l'environnement. En effet, dans un environnement favorable, *P. aeruginosa* est capable de proliférer, devenir pathogène et former un biofilm conduisant à une diminution de la sensibilité bactérienne que ce soit aux défenses de l'hôte ou aux agents antimicrobiens.

Pour contrôler sa virulence, *P. aeruginosa* utilise un système de communication bactérienne, le *quorum* sensing (QS), un mécanisme moléculaire lui permettant d'adapter son comportement et de synchroniser son expression génétique en fonction de sa densité de population en utilisant AHL comme molécules médiatrices.

Le choix du QS comme cible, pour inhiber la formation de biofilm et limiter la pathogénicité des bactéries, s'avère particulièrement prometteur. Cette stratégie, appelée *quorum* quenching, présente le grand intérêt de limiter l'émergence de résistances puisque elle permet aux bactéries de se développer de manière commensale. Parmi les inhibiteurs du QS, on distingue les enzymes dégradant les AHL qui ont été largement décrites (dont les lactonases).

Nous nous sommes intéressés, dans cette partie de travail, à la lactonase *SsoPox* produite par *Sufolobus Solfataricus* et en particulier à sa variante *SsoPox-W263I* déjà étudiée pour sa capacité à dégrader les molécules de signalisation des AHL.

L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet inhibiteur du QS par la lactonase *SsoPox-W263I*, sur des souches de *P. aeruginosa* isolées des appareils respiratoires de veaux atteints de pneumonie et sur de pieds diabétique. Cette partie a été réalisée au laboratoire de Bio-cristallographie, biotechnologie et enzymologie structurale, dirigé par le Pr Chabrière E. qui a mis au point cette lactonase caractérisée par un haut niveau de stabilité et d'affinité.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Production de la protéine *SsoPox W263I*

Le gène codant pour le variant de *SsoPox W263I* a été optimisé pour être exprimé dans la souche *E. coli* BL21 (DE3)-pGro7/GroEL (TaKaRa) après avoir été cloné dans le plasmide pET22b-*SsoPoxW263I* (Hiblot *et al.* 2012b; Bzdrenga *et al.* 2014).

Une préculture a été préparée en ensemençant une suspension *E. coli* BL21 préalablement conservées par congélation dans du glycérol (40 %) dans du milieu de culture LB (Luria Bertani) liquide (BD, Difco™ LB Broth, Miller).

Le lendemain, cette préculture a servi à ensemencher, avec un *ratio* de 1/100, une culture de milieu ZYP (Annexe E) additionné d'ampicilline (100 µg/mL) et de chloramphénicol (34 µg/mL) puis incubé à 37 °C sous agitation (Agitateur de plaque 450 rpm) jusqu'à obtenir une DO_{600nm} comprise entre 0,8 et , à cette DO, la surexpression des chaperonnes Gro7/EL est induite par ajout de l'arabinose à 0,2% (Poids/volume) pour mieux solubiliser *SsoPox* W263I. Par la suite, le Chlorure de Cobalt (CoCl₂) a été ajouté pour une concentration finale de 0,2 mM. L'incubation a eu lieu à 23 °C pendant 20 heures.

En fin, les cellules sont collectées par centrifugation à 4400 g à 4 °C, pendant 20 min. Le surnageant étant éliminé, les culots ont été re-suspendus dans le tampon de lyse (Annexe E), et stockées à -80 °C la nuit entière.

Les échantillons ont été décongelés à 37 °C pendant 15 min et traités par sonication (3 étapes de 30 secondes) pour la lyse mécanique des cellules bactériennes (Amplitude 45, time 00:30, pulse on 00:01, pulse off 00:01). Les débris cellulaires sont finalement éliminés par centrifugation (21000 g, 15 min, 4 °C).

2.2. Purification de la protéine *SsoPox* W263I

La purification de *SsoPox* a été faite selon le protocole expérimental proposé par Hiblot *et al.*(2012a).

2.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sel le plus utilisé pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) car très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il a peu d'effets dénaturants et maximise l'obtention de protéines biologiquement actives.

Nous avons chauffé les échantillons de l'extrait brut contenant *SsoPox* W263I à 80°C pendant 30 min. Après une centrifugation de 15 min à 21000 g, le surnageant a été récupéré puis la protéine *SsoPox* W263I a été concentrée par une précipitation au sulfate d'ammonium (Saturation 75 %), pendant une nuit à 4 °C. Le précipité a été récupéré par

centrifugation à 21000 g, 4 °C pendant 15 min, puis solubilisé dans 8 mL de tampon d'activité (Annexe E).

2.2.2. Purification en utilisant l'automate ÄKTA

L'étape de dessalage et la chromatographie par exclusion de taille ont été réalisées en utilisant l'automate de purification ÄKTA.

2.2.2.1. Etape de dessalage

La concentration en sulfate d'ammonium étant trop élevée, une étape de dessalage était nécessaire. Pour se faire, une colonne de dessalage (HiPrep 26/10 desalting, GE Healthcare ; ÄKTA Avant) a été utilisée. Cette colonne sépare les molécules en fonction de leur taille. Cette technique peut être utilisée pour dessaler et éliminer des contaminants de faible poids moléculaire. Les fractions contenant la protéine ont été concentrées par centrifugation en utilisant un amicon (Merck Millipore), jusqu'à un volume de 2 mL.

2.2.2.2. Chromatographie par exclusion de taille

Après dessalage et concentration de l'échantillon protéique, un passage de celui-ci en colonne de chromatographie par exclusion de taille (ou gel-filtration) (HiLoad 16/600 Superdex 75pg, GE Healthcare; ÄKTA Avant) a été réalisé afin de purifier et homogénéiser les échantillons. La pureté de la protéine étant vérifiée par une séparation au SDS-PAGE 10 %, puis la concentration protéique a été mesurée en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.3. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire et d'estimer leur degré de pureté. Les molécules sont préalablement soumises à un traitement dénaturant détruisant la structure tridimensionnelle native. En présence de 2-mercaptoéthanol et de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), toutes les sous-unités polypeptidiques de la protéine perdent leurs ponts disulfures, et se dénaturent en formant des micelles avec le SDS. Toutes les micelles présentent alors une charge négative proportionnelle à la masse moléculaire.

Nous avons utilisé la technique décrite par Laemmli (1970) : Cinq µL d'échantillon protéique purifié par chromatographie d'exclusion de taille ont été dilués dans 15 µL de bleu de Laemli (Annexe F) puis chauffés pendant 10 minutes à 90 °C avant d'être déposés sur le

gel SDS-PAGE à 10 % (Gel de concentration 4 %, pH 6,8 et gel de séparation 10 %, pH 8,8. Annexe F).

La migration protéique a eu lieu sous une tension de 130v pendant 1 h 10 min. Une fois la migration terminée, les protéines ont été révélées par la coloration au bleu de Coomassie pendant 15 min puis la décoloration a duré une heure dans une solution d'éthanol 40 %, acide acétique 10% et eau pure, puis laissées dans l'eau pure 7 à 8 h. Un marqueur de poids moléculaire (Novex Sharp 10-260 KDa, Invitrogen) a été employé comme référence. L'observation du gel et la détermination de la pureté de la protéine ont été réalisées sur le programme ImageLab.

2.4. Mesure de l'activité de *SsoPox*

L'activité de *SsoPox* est déterminée par des mesures spectrophotométriques, basées sur la loi de Beer-Lambert.

Un volume réactionnel de 200 μ L a été obtenu en additionnant 2 μ L de *SsoPox* purifiée à 98 μ L de tampon d'activité de *SsoPox* et 100 μ L de paraoxon à 2 mM. La cinétique est mesurée pendant 10 min dans le lecteur de plaques par suivi de la production de *p*-nitrophénolphosphate à une longueur d'onde de 405 nm. Le blanc est préparé en mélangeant 100 μ L de tampon d'activité avec 100 μ L de paraoxon.

2.5. Bactéries et conditions de culture

Sept souches de *P. aeruginosa* ont été utilisées dans cette étude afin de tester l'effet antivirulent de *SsoPox* W263I :

- Trois ont été isolées des poumons des veaux pneumoniques (V1,V2,V3) abattus à l'abattoir de Batna (Oucheryah, 2015).
- Une souche de référence *P. aeruginosa* PA01 (ID taxonomique : 208964)
- Trois souches cliniques d'origine humaine (D1, D2, D3) provenant des ulcères des pieds diabétiques.

Les sept souches ont été confirmées par MALDI TOF-MS en utilisant le système Bruker Daltonics.

Les souches de *P. aeruginosa* ont été pré-cultivées en milieu LB pendant 6 h à 37 °C sous agitation à 650 rpm. Ensuite, 3 μ L de pré-culture ont été inoculés dans 3 mL de LB additionné de sang de mouton à 2 % (Biomérieux, France) puis incubation à 37 °C sous agitation rotative constante à 650 rpm/ min 48h. Les cultures sont faites, en quadruple pour

chaque souche. Deux flacons de chaque souche ont été utilisés avec 0,5 mg/mL de *SsoPox* pour tester l'effet antivirulent de cette protéine. Les deux autres flacons, des mêmes souches, ont été additionnés de tampon *SsoPox* pour remplacer le volume de la protéine (Figure 17).

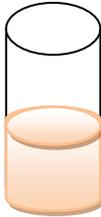
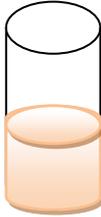
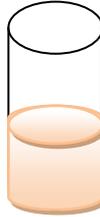
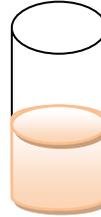
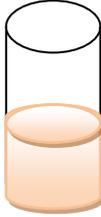
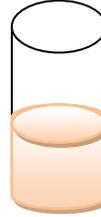
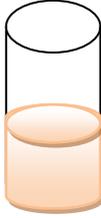
	Répétition	PA01	V1	V2	V3	D1	D2	D3
Contrôles sans <i>SsoPox</i> (3 mL de LB + 3 µL pré-culture)	r1							
	r2							
Traités avec <i>SsoPox</i> (3mL de LB+ 3 µL pré-culture+ <i>SsoPox</i> 0,5 mg/mL)	r1							
	r2							

Figure 17: Plan expérimental adopté pour tester l'effet de la protéine *SsoPox* W263I sur les trois facteurs de virulence des sept isolats

L'activité anti-virulente de la *SsoPox* W263I a été vérifiée sur trois facteurs de virulence chez les sept souches testées. Ces facteurs étant : Activité protéolytique, production de pyocynine et production de biofilm.

2.6. Effet de *SsoPox* sur la croissance de PA01

Ce test a été réalisé dans le but de vérifier que *SsoPox* n'affecte pas la croissance bactérienne des souches testées. Nous avons suivi la croissance de PA01, sans et avec *SsoPox*, en mesurant la DO_{600nm} pendant 24 heures.

2.7. Mesure des facteurs de virulence

L'activité protéolytique et la production de pyocyanine ont été mesurées 24 heures après l'inoculation. Le poids du biofilm a été déterminé après 48 heures.

Les surnageants utilisés pour mesurer l'activité protéolytique et la production de pyocyanine ont été obtenus après transfert de 1 mL de culture chacune des quartes dans des Eppendorfs de 1,5 mL puis centrifugation à 12 000 g pendant 15min.

2.7.1. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des isolats a été mesurée selon la méthode modifiée décrite par Nicodème *et al.* (2005). La mesure de l'hydrolyse de l'azocaséine par les sept isolats a été effectuée après incubation de 50 µL de surnageant additionnés de 1350 µL de tampon PBS pH7 et 100 µL d'azocaséine (Sigma, St. Louis, USA) (30 mg/mL dissouts dans l'eau ultra-pure). Après une heure d'incubation à 37 °C. La réaction enzymatique a été inhibée par addition de 250 µL de l'acide trichloracétique (TCA) 20% (m/v) au mélange réactionnel. Le mélange a été centrifugé à 12000 g pendant 10 min. L'absorbance du surnageant est mesurée à 366 nm dans un volume de 200 µL en utilisant une plaque de 96 puits (6.2-mm path length cell) et un lecteur de plaque (Synergy HT) avec le logiciel Gen5.1 comme spectrophotomètre. Les témoins négatifs sont réalisés en utilisant 50 µL de milieu LB avec et sans *SsoPox* 500 µg/mL filtrée (0,2 mm pore).

2.7.2. Mesure de la production de la pyocyanine

La production de la pyocyanine a été mesurée selon la méthode de Hraiech *et al.* (2014). L'extraction de la pyocyanine a été réalisée sur 500 µL de surnageant (Le même utilisé pour la mesure de l'activité protéasique) en ajoutant 250 µL de chloroforme. Le mélange réactionnel a été vortexé pendant 20s puis centrifugé à 12000 g pendant 5min. La concentration de pyocyanine étant évaluée par mesure de l'absorbance à 690 nm.

2.7.3. Mesure du poids du biofilm

Après 48 h d'incubation, chaque culture a été tamisée par passage à travers des pores de taille de 100 µm (Corning, New York, USA) pour séparer le biofilm des cellules planctoniques. Le biofilm a été lavé avec 2 mL de PBS et centrifugé à 600 g pendant 5 min. Les biofilms ont été pesés directement dans les tamis cellulaires.

3. RÉSULTATS

3.1. Purification de *SsoPox* W263I

La SDS-PAGE de la protéine *SsoPox* W263I montre une bande indiquant une masse moléculaire avoisinant les 35 kDa (Taille des monomères: 35,5 kDa) et le degré de purification est de 89,3 (Fig. 18).

La concentration en protéines mesurées par le Nanodrop (Bradford : $\lambda = 280$ nm) est de 35,59 mg/mL. Sachant que le degré de pureté de l'enzyme obtenu par SDS PAGE est de 89,3 % (Fig. 18), la concentration finale de l'enzyme est donc de 31,78 mg/mL.

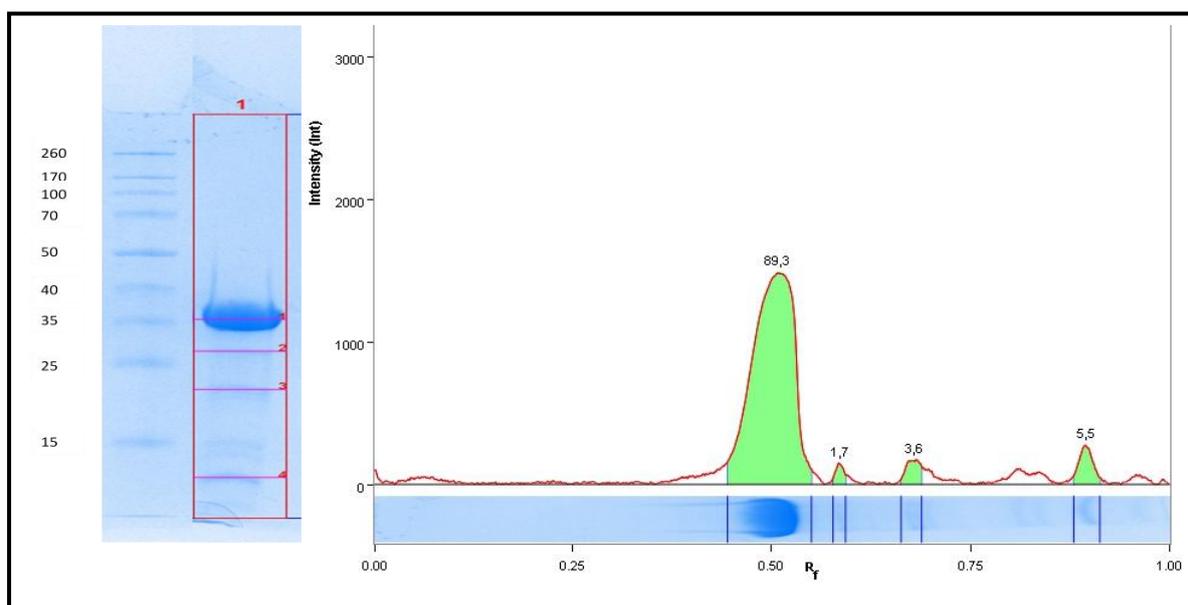


Figure 18 : Gel SDS-PAGE 10 % révélé au bleu de Coomassie montrant la purification de *SsoPox* W263I en conditions dénaturantes. Ligne gauche : marqueur de poids moléculaire (Thermo Scientific Spectra Multicolor broad range protein ladder; labelled in kDa). Ligne droite : *SsoPox* diluée à 1/10.

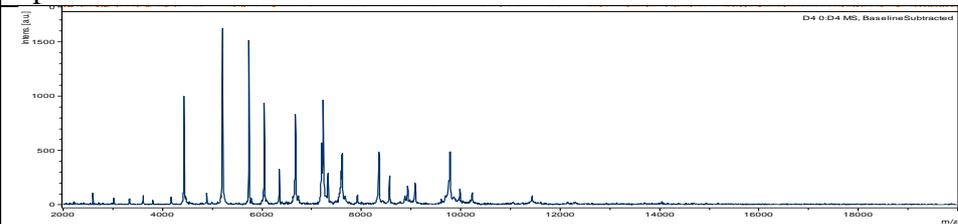
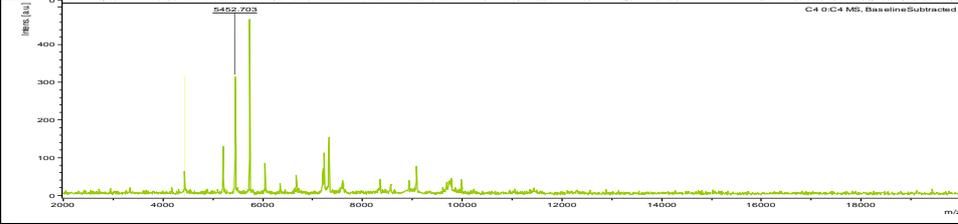
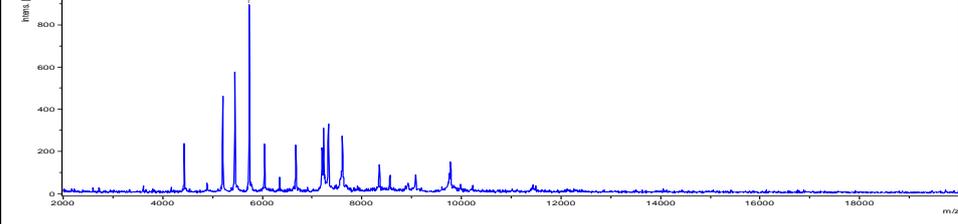
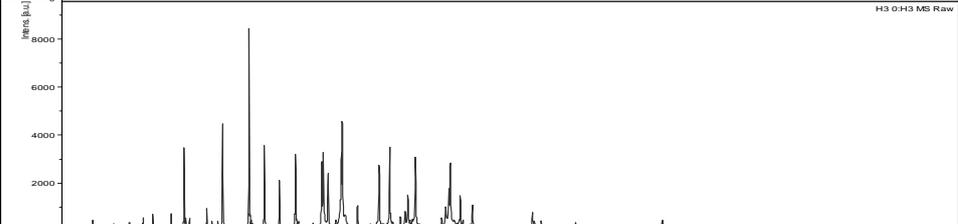
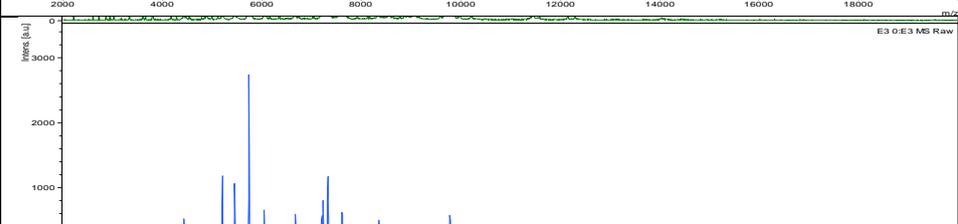
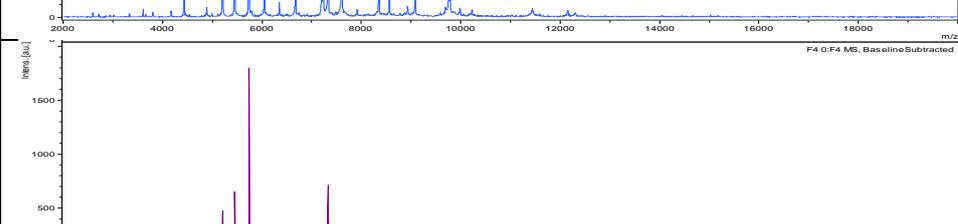
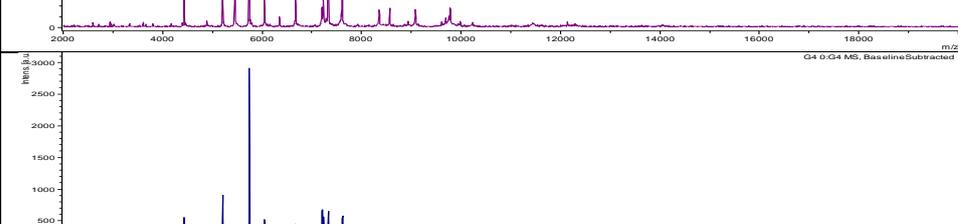
3.2. Mesure de l'activité phosphotriestérase

La loi de Beer-Lambert permet de passer de l'absorbance à la concentration selon le modèle linéaire $A = \epsilon.l.[C]$ (Voir calculs en annexe G). L'activité enzymatique obtenue est égale à : 19,53 U.

3.3. Confirmation des sept *P. aeruginosa* par MALDI-TOF MS

Les sept isolats utilisés dans cette partie de travail, ont été confirmés par la base de données MALDI-TOF MS en tant que *P. aeruginosa*. Les scores et les spectres sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Scores et spectres des différentes souches de *P. aeruginosa* testées

Isolat	Score	Spectre
PA01	<u>2,351</u>	
V1	<u>2,184</u>	
V2	<u>2,257</u>	
V3	<u>2,122</u>	
D1	<u>2,149</u>	
D2	<u>2,281</u>	
D3	<u>2,17</u>	

3.4. Effet de *SsoPox* sur la croissance de PA01

Nous constatons que l'addition de *SsoPox* n'a pas d'effet inhibiteur sur la croissance de *P. aeruginosa* PA01 comparativement au témoin (Fig.19).

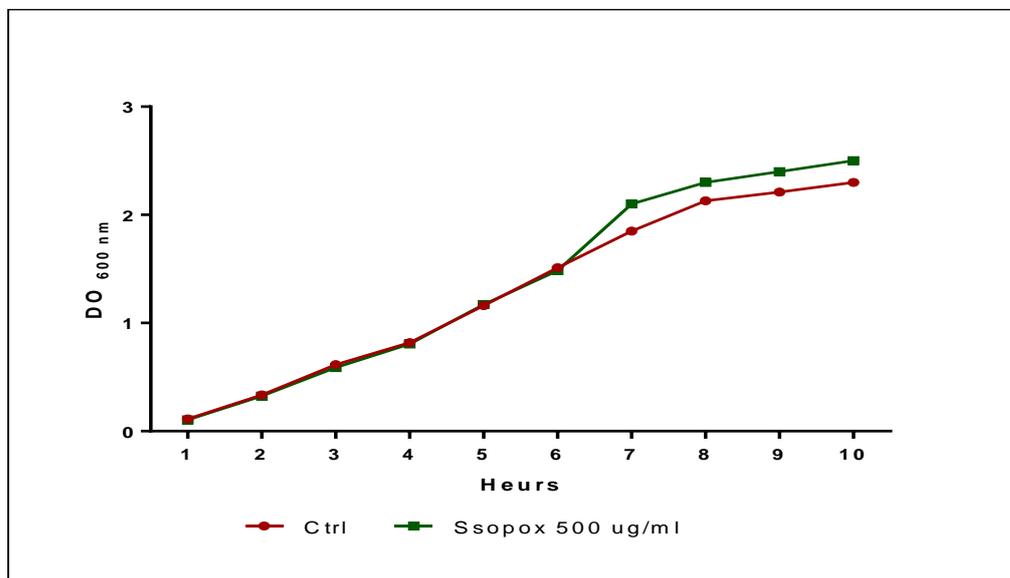


Figure 19: L'effet de *SsoPox* sur la croissance de PA01

3.5. Effet sur les facteurs de virulences

3.5.1. L'activité protéolytique

Les activités protéolytiques, exprimées en DO_{366nm} , varient de 0,874 à 1,142 chez les sujets sans le *SsoPox* (Annexe H) avec une moyenne $m = 1,003$ et un écart-type $s = 0,083$ (Tableau 16). Nos résultats montrent une diminution de l'activité protéasique, pour toutes les souches, en présence de *SsoPox* (0,5 mg/mL) par rapport aux contrôles (moyenne $m = 0,118$ et un écart-type $s = 0,304$). La comparaison des deux moyennes pour les deux groupes (avec et sans *SsoPox*) a donné une valeur de Student $t = 7,842$ ($ddl = 6$, $p = 0,0002$). Nous avons observé une inhibition complète de la production des protéases pour la souche de référence PA01 et pour les quatre isolats V1, V3, D2 et D3.

Tableau 16: L'effet de *SsoPox* sur l'activité protéolytique des 7 isolats

Isolat	Sans <i>SsoPox</i> (Moyenne)	Avec <i>SsoPox</i> 0.5 mg/mL (Moyenne)
PA01	0,878	0
V 1	1,044	0
V 2	1,038	0,807
V 3	0,889	0
D1	1,077	0,021
D2	1,036	0
D3	1,059	0
Moyenne	1,003	0,118
Ecart type	0,083	0,304

3.5.2. Effet sur la sécrétion de la pyocyanine

Toutes les souches ont produit la pyocyanine en absence de la protéine *SsoPox*, avec des variations (exprimées en DO_{690nm}) allant de 0,03 à 0,288 (Annexe H) et une moyenne de 0,169 et un écart-type de 0,0794 (Tableau 17). La production de ce facteur de virulence a été réduite pour les sept souches en présence de *SsoPox* par rapport aux contrôles (une moyenne de 0,076 et un écart-type de 0,0683). Elle a été complètement inhibée pour la PA01 et deux isolats cliniques humains D2 et D3.

Tableau 17 : Résultats de l'effet de *SsoPox* sur la production de la pyocyanine des 7 isolats

Isolat	Sans <i>SsoPox</i> (Moyenne)	Avec <i>SsoPox</i> 0.5 mg/mL (Moyenne)
PA01	0,125	0
V 1	0,191	0,114
V 2	0,256	0,149
V 3	0,157	0,149
D1	0,268	0,082
D2	0,15	0
D3	0,0365	0
Moyenne	0,169	0,0706
Ecart type	0,0794	0,0683

3.5.3. Effet sur la production du biofilm

Nous observons que la souche PA01 et les trois isolats humains (D1, D2 et D3) forment un biofilm plus important que celui des isolats bovins (V1, V2 et V3) en absence de

SsoPox. La valeur moyenne du poids du biofilm humide pour les sept isolats étant de 33,65 mg (écart-type $s = 40,936$) (Tableau 18) avec des valeurs allant de 3 mg à 119,1 mg (Annexe H). Cependant, en présence de la *SsoPox*, nous constatons une très faible production du biofilm sur le total des sept isolats, avec une moyenne de 6,84 et un écart-type $s = 7,583$ (Tableau 18).

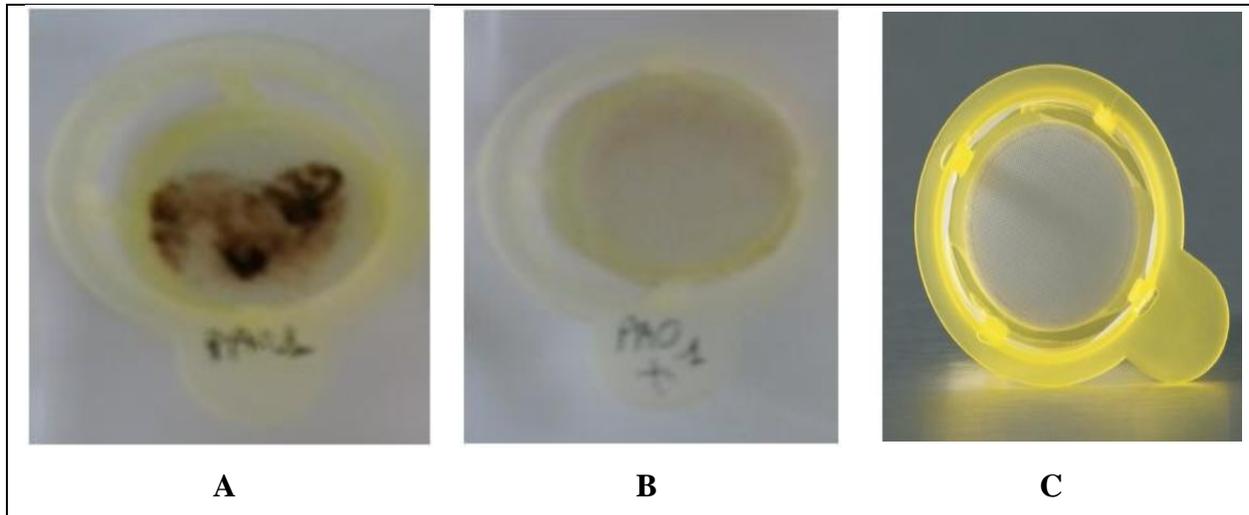


Figure 20: Mesure du biofilm par pesage direct des agrégats cellulaires. A : Présence d'un biofilm de PAO1 en absence de *SsoPox* ; B : Absence d'un biofilm de PAO1 en présence de *SsoPox* ; C : Tamis témoin sans culture.

Le biofilm a été réduit, en présence de *SsoPox*, dans six isolats y compris la souche PAO1. Cinq ont considérablement perdu leur capacité à développer des biofilms (V2, V3, D1, D2 et D3). L'isolat bovin V1, présente un biofilm plus épais en présence de *SsoPox* comparativement au contrôle.

Tableau 18 : Résultats de l'effet de *SsoPox* sur la production du biofilm des 7 isolats

Isolat	Sans <i>SsoPox</i> (Moyenne)	Avec <i>SsoPox</i> 0.5 mg/mL (Moyenne)
PAO1	46,4	2,5
V 1	7,63	10,75
V 2	4,04	1,37
V 3	5,59	2,16
D1	118,1	5,5
D2	14,15	3,15
D3	39,7	22,45
Moyenne	33,658	6,84
Ecart type	40,936	7,583

En somme, la protéine SsoPox a donné des résultats satisfaisants vis-à-vis des trois facteurs de virulence (Figure 21), en réduisant l'effet virulent des sept souches testées.

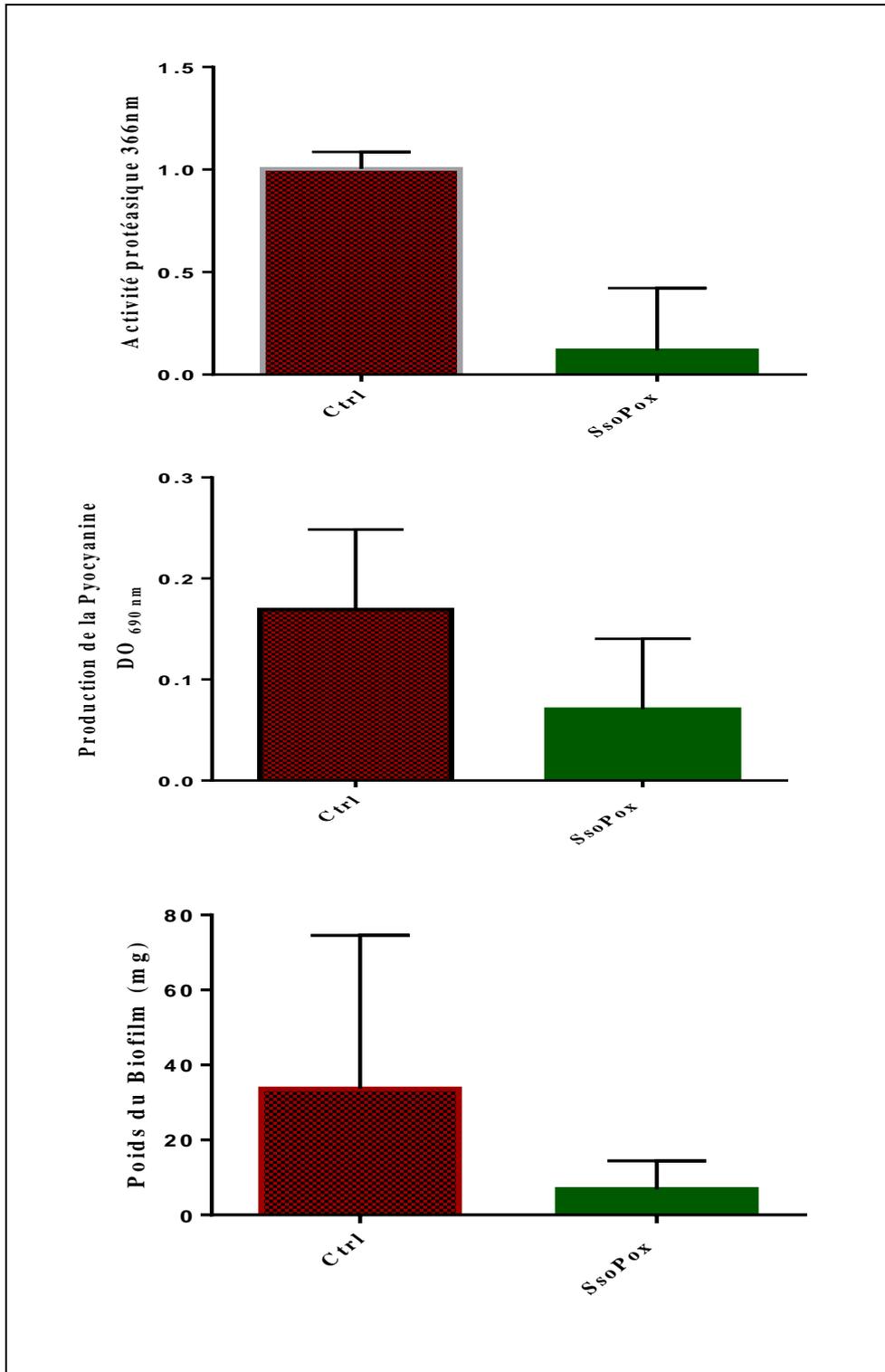


Figure 21: Effets de SsoPox sur les facteurs de virulence des sept isolats

4. DISCUSSION

Les traitements des infections bactériennes, par l'utilisation des antibiotiques, sont parfois peu efficaces et aboutissent à l'émergence de nouvelles souches résistantes. Chez de nombreuses bactéries, la signalisation QS contrôle les processus de virulence lors de l'interaction avec un hôte.

P. aeruginosa, un des principaux pathogènes responsables des infections humaines et animales, présente une résistance remarquable vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2011). Par conséquent, le développement d'autres voies antimicrobiennes et de nouvelles méthodes thérapeutiques devient de plus en plus nécessaire. Parmi ces tentatives, le QS a été proposé comme cible (Rasko et Sperandio, 2010), car plusieurs facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sont activés par ce phénomène (Winzer et Williams, 2001).

La perturbation du QS peut se faire à différentes étapes. Soit en empêchant les bactéries de produire ou de percevoir les AHL par l'utilisation d'inhibiteurs, soit par la dégradation des molécules par voie enzymatique après leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. Plusieurs enzymes responsables de l'inactivation des signaux QS ont été identifiées. L'enzyme *SsoPox* de *Sulfolobus solfataricus*, isolée des sources d'eau chaudes du Vésuve (Naples, Italie), a été étudiée pour son activité lactonase. Cette enzyme est extrêmement stable et présente un très fort potentiel biotechnologique pour des applications médicales puisqu'elle perturbe le QS des bactéries à Gram négatif permettant ainsi d'inhiber leur virulence. En effet, sa stabilité lui confère, d'une part, un large spectre applicatif, mais également une tolérance aux mutations conduisant à une amélioration de son activité de dégradation des lactones par des techniques d'ingénierie enzymatique.

Dans ce travail, l'enzyme utilisée est une variante de *SsoPox*, la *SsoPox* W263I. Son activité vis-à-vis des substrats 3-oxo-C12-AHL, principales molécules utilisées par *P. aeruginosa* pour mettre en place sa virulence via le QS, est améliorée, par rapport à l'enzyme sauvage de plus de 45 fois, tout en maintenant une thermostabilité élevée ($T_m = 88$ °C).

L'effet antivirulent de ce variant n'a été démontré que pour les souches de laboratoire PA01 et PA14 (Hraiech *et al.*, 2014) et contre des isolats responsable des ulcères diabétiques humains. Son efficacité contre les isolats vétérinaires n'a pas encore été étudiée. Dans cette partie, le potentiel *quorum quenching* de *SsoPox*-W263I a été testé sur des 7 isolats de *P. aeruginosa*.

Le protocole que nous avons utilisé pour la production et la purification de l'enzyme *SsoPox* a été déjà mis au point (Hiblot *et al.*, 2012a). Pour déterminer la pureté de l'échantillon protéique que nous avons produit, une électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a été réalisée. Le résultat de la migration protéique a révélé une bande avec un poids moléculaire proche de 35 KDa, représentant la forme monomérique de *SsoPox*. En effet, la protéine *SsoPox*, en solution, est en équilibre entre forme dimérique et monomérique (Merone *et al.*, 2005) et à température de vie de *S. solfataricus* (50-87 °C) pour laquelle les interactions hydrophobes de la protéine sont favorisées (Auernik, Cooper et Kelly, 2008).

Nous avons évalué l'effet de *SsoPox* sur la croissance bactérienne de *P. aeruginosa* PA01. La concentration de l'enzyme protéique utilisée était de 0,5 mg/mL. Nous avons observé que l'ajout de cette enzyme n'avait aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne comme il a été observé par d'autres travaux (Ng, Wright et Seah, 2011; Hraiech *et al.*, 2014).

Nos résultats montrent qu'il y a une grande variabilité dans les niveaux basiques de production de pyocyanine, de protéase et de biofilm chez les sept isolats testés. Une telle variabilité de production de ces facteurs était déjà observée dans les isolats cliniques respiratoires (Le Berre *et al.*, 2008) et dans les souches environnementales (Grosso-Becerra *et al.*, 2014). Ces facteurs de virulence sont régulés par le QS. (Ce dernier étant dépendant de quatre systèmes différents hiérarchiquement organisés: *Las*, *Rhl*, *vqsR* et *Pqs*).

Le premier système à activer est le système *Las* qui dépend de la production et de la perception de la lactone 3-oxo-C12-AHL (Gambello et Iglewski, 1991; Pearson *et al.*, 1994). L'induction du système *Las* déclenche l'expression de différents facteurs de virulence et active les autres systèmes QS. Le QS de *P. aeruginosa* semble donc être sous contrôle de la concentration en 3-oxo-C12-AHL. En revanche, les 3-oxo-C12-AHL produites par *P. aeruginosa* ne régulent pas seulement la virulence bactérienne mais aussi permettent de réduire la réponse immunitaire contre *P. aeruginosa* en stimulant les activités des cellules eucaryotes importantes pour l'inflammation et les défenses immunitaires (Smith *et al.*, 2002), créant ainsi un environnement dans lequel les bactéries peuvent survivre plus facilement. En effet, les facteurs de virulences comme les protéases et le pyocyanine secrétées lors de l'infection *des voies aériennes* par *P. aeruginosa* étaient responsables de la destruction des tissus de l'hôte et de la répression de la réponse immunitaire (Suter, 1994; Allen *et al.*, 2005).

L'activité protéolytique a été réduite dans 100 % des isolats avec une inhibition complète de production dans 86 % des isolats. La production de pyocyanine a diminué dans

100 % des isolats avec élimination complète de production dans 43 %. Des résultats similaires ont été rapportés concernant l'utilisation des lactonases pour inhiber la virulence de *P. aeruginosa* : Reimann *et al.* (2002) ont cloné le gène *aiiA* chez *P. aeruginosa* PA01 et ont montré une réduction de la production d'exo-produits impliqués dans la virulence du microorganisme comme l'élastase, les rhamnolipides et de la pyocyanine mais également une réduction de sa motilité. Un autre travail (Migiyama *et al.*, 2013), mené sur des souris, a montré que l'expression de la lactonase *aiiM* chez *P. aeruginosa* PA01 a fortement réprimé l'accumulation des AHL, la production de la pyocyanine et l'élastase. Ils ont également observé une diminution de la mortalité et des lésions histologiques de pneumonie chez les animaux infectés avec la souche mutée.

Nous nous sommes également intéressés à la formation de biofilm par *P. aeruginosa*. Le biofilm constitue un des aspects de la virulence de *P. aeruginosa*, car il favorise la croissance bactérienne et confère une protection aux colonies vis-à-vis de la diffusion des molécules antibiotiques. Il a été démontré que les *P. aeruginosa*, dans le biofilm, sont 100 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens que les cellules planctoniques (Brooun, Liu, & Lewis, 2000). Ce qui nous a incité à évaluer l'effet de l'enzyme *SsoPox* W263I sur la formation de biofilm. Nous avons observé une diminution (dans 86 % des isolats) de la synthèse du biofilm induite par *SsoPox* W263I. Nos résultats obtenus *in vitro* indiquent que *SsoPox* W263I a inhibé la production de biofilm chez les souches étudiées. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Gupta *et al.* (2015) où ils ont montré l'efficacité d'une lactonase purifiée provenant de *Bacillus sp.* ZA12 sur la réduction du biofilm en utilisant un modèle d'infection des souris utilisant *P. aeruginosa* PA01. Ainsi, des paraoxonases humaines (Khersonsky et Tawfik, 2005; Estin, Stoltz et Zabner, 2010) ont été exprimées chez *P. aeruginosa* et ont montré une réduction de la formation de biofilm et la résistance aux antibiotiques. En outre, dans un rapport publié par Bijtenhoom *et al.* (2011) ont montré que l'expression d'un hétérologue de la réductase *BpiB09* atténue la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PA01.

Au cours des essais expérimentaux réalisés dans notre étude, nous avons remarqué que les biofilms de *P. aeruginosa* traités avec *SsoPox* étaient plus minces et plus dispersés par rapport aux contrôles positifs ; ce qui révèle une approche potentielle pour augmenter la sensibilité de *P. aeruginosa* à un traitement antibiotique. Selon Chang *et al.* (2017), l'utilisation des inhibiteurs de *QS* en conjonction avec des antibiotiques peut améliorer la destruction d'agents pathogènes à travers deux mécanismes possibles :

- i. la combinaison d'un QSI et d'un antibiotique pourrait perturber la structure multicellulaire du biofilm, ce qui rend les bactéries sensibles à l'éradication par des antibiotiques et / Ou
- ii. l'architecture du biofilm dépend principalement de la sécrétion d'une substance exopolymérique régulée par AHL, Par conséquent, l'inhibition de l'AHL peut empêcher la synthèse de ces substances exopolymériques, conduisant à une structure de biofilm lâche de *P. aeruginosa* PA01.

Différentes approches thérapeutiques non antibiotiques ont été envisagées pour atténuer la virulence de *P. aeruginosa*, en utilisant les furanones qui sont des antagonistes des AHL, sur le pathogène *P. aeruginosa in vitro* (Wu *et al.*, 2004) mais également *in vivo* (Christensen *et al.*, 2012). De manière analogue, des extraits d'ail, du 4-NPO ou encore de la patuline permettent de réduire la mortalité due à *P. aeruginosa* chez des modèles animaux (Rasmussen & Givskov, 2006). Bien qu'efficaces, ces molécules sont néanmoins peu stables pour certaines ou encore toxiques pour d'autres. Ainsi, une augmentation de la production des facteurs de virulence par traitement non enzymatique avec des inhibiteurs de QS a déjà été signalée lorsque des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de fibrose kystique ont été traitées avec la furanone C-30 et la 5-fluorouracile 5-FU ou lorsque des isolats d'origine diverse (voies urinaires, infection de plaie, sang et les voies respiratoires) ont été exposés à des inhibiteurs naturels tels que la catéchine, la caféine, la curcumine ou l'acide salicylique (García-Contreras *et al.*, 2013, 2015; Sethupathy *et al.*, 2016). En effet, contrairement aux inhibiteurs de QS les enzymes comme *SsoPox* n'ont pas montré ce phénomène de résistance.

Dans cette étude, *SsoPox* W623I a réduit la formation de biofilm et la production de facteurs de virulence, en particulier la pyocyanine et les protéases. En conclusion, l'enzyme *SsoPox* W263I par l'inhibition du QS atténue le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* non pas en inhibant la croissance de la biomasse bactérienne, mais en les maintenant dans un état non virulent, sans former de biofilms importants.

Conclusion générale et perspectives

La première partie de ce travail a concerné l'utilisation de la technique MALDI-TOF MS dans l'identification des bactéries isolées à partir de laits de vaches atteintes de mammites subcliniques au niveau de deux fermes situées à l'Est algérien : Constantine et Batna. Nous avons pu montrer qu'en dehors de la biologie clinique humaine ; la spectrométrie de masse pourrait se révéler un atout dans le domaine de la biologie vétérinaire, étant donné que tous les isolats bactériens sauf l'isolat 13 ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce par cette technique spectrométrique.

Parmi les quatorze isolats, huit individus différents appartenant à cinq espèces ont été identifiés en tant que staphylocoques à coagulase négative.

En comparaison avec les méthodes génotypiques réalisées dans cette thèse (*ADNr16S* et *rpoB*), le MALDI-TOF MS remplit les exigences nécessaires à la confirmation et à l'identification des bactéries cliniques vétérinaires. Plus rapide que les méthodes de la microbiologie traditionnelle, moins chère et nécessitant moins d'expertise technique que les méthodes génotypiques, et ayant le même niveau de discrimination que celles-ci, le MALDI-TOF MS peut en outre être utilisé dans les laboratoires d'analyses de microbiologie vétérinaire de routine où le facteur temps joue un rôle clé pour la prise en charge des infections animales. Cependant, les bases de données MALDI-TOF ne sont pas totalement exhaustives et il n'est donc pas possible d'identifier tous les micro-organismes et pour certaines espèces qui sont proches comme dans le cas des espèces du genre *Aeromonas*, la création de « sous-bases de données ou bases de données spécifiques » construites sur des bactéries de ce genre ayant subi une extraction préalable, pourrait permettre une bonne identification à l'échelle de l'espèce. Enfin, d'autres études sont nécessaires pour tester l'applicabilité du MALDI-TOF pour détecter les bactéries directement dans le lait infecté.

L'assistance des programmes bioinformatiques comme outils d'aide à la décision, dans le vaste domaine de la systématique bactérienne a été, en partie, mise en évidence dans cette thèse. Nous avons essayé de montrer que la prédiction des structures secondaires voire tertiaires par calculs bioinformatiques, à partir des séquences primaires de gènes d'intérêt (codants et/ou non), apportait des éléments et des informations supplémentaires pour confirmer la place de l'isolat dans l'arbre phylogénétique bactérien. Il reste, ce pendant, à développer des programmes plus puissants (temps et score des réponses) pour aligner ses structures secondaires et tertiaires afin d'attribuer des motifs structuraux et fonctionnels

spécifiques pour chaque groupe bactérien faisant foi d'une signature et d'une empreinte moléculaires.

Il serait plus judicieux, pour les microbiologistes, de créer, avec l'aide et la contribution de bioinformaticiens et de biostatisticiens, des bases de données spécifiques, voire locales, regroupant les structures de ces motifs structuraux et fonctionnels pour faciliter l'identification des isolats bactériens.

Il est temps de porter un nouveau regard à la systématique bactérienne pour faire impliquer d'autres matières et faire émerger une nouvelle vision des données expérimentales avec de nouvelles idées pour maximiser l'exploitation des informations dans le domaine de la recherche, en particulier, celui de la biotechnologie !

Nous avons également évalué, en collaboration avec l'équipe du professeur Chabrière (URMITE), une nouvelle modalité anti-virulente, en utilisant la lactonase, *SsoPox W263I*, qui est capable d'hydrolyser les acylhomoserine-lactones impliqués dans le *quorum* sensing de *P. aeruginosa*. Nous avons montré que cette enzyme, par l'inhibition du *quorum* sensing atténue, *in vitro*, le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* isolées des veaux atteints de pneumonie, en ne tuant pas les bactéries mais en réduisant la formation du biofilm et la production de facteurs de virulence, en particulier la pyocyanin et les protéases.

L'enzyme *SsoPox*, fait l'objet d'une attention particulière car elle est à la fois très active pour la dégradation des lactones et extrêmement stable, pour cela, elle pourrait se concevoir dans plusieurs applications thérapeutiques : la voie aerosolisée, incorporation dans des dispositifs médicaux dans le but de lutter contre le biofilm et les infections bactériennes (par exemple dans des pansements ou des cathéters et les sondes d'intubation), ou l'association avec les antibiotiques par voie systémique.

Elle peut être utilisée non seulement sur le pathogène *Pseudomonas aeruginosa* mais également contre d'autres bactéries capables d'adopter un comportement social par la production-détection d'acyl-homoserine-lactone (AHL) comme *Acinetobacter baumannii*.

Son utilisation est actuellement à l'étude chez l'homme, dans des pansements pour militaires afin d'éviter d'éventuelles complications et infections en cas de blessure. La phase des tests précliniques pour les pansements est en cours, avant de pouvoir les tester sur les patients (Projet porté par la société Gene GreenTK en vue de sa commercialisation).

Références bibliographiques

- Abdel-rady, A. (2009). Epidemiological Studies on Subclinical Mastitis in Dairy cows in Assiut Governorate. *Veterinary World*. **2**(10), 373–380.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I., et Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **30**(5), 627–634. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0260OC>
- Afriat-Jurnou, L., Roodveldt, C., Manco, G., et Tawfik, D. S. (2006). The Latent Promiscuity of Newly Identified Microbial Lactonases Is Linked to a Recently Diverged Phosphotriesterase. *Biochemistry*. **45**(46), 13677–13686. <http://doi.org/10.1021/bi061268r>
- Afriat-Jurnou, L., Jackson, C. J., et Tawfik, D. S. (2012). Reconstructing a Missing Link in the Evolution of a Recently Diverged Phosphotriesterase by Active-Site Loop Remodeling. *Biochemistry*. **51**(31), 6047–6055. <http://doi.org/10.1021/bi300694t>
- Agroline (2014). Salon internationale de l'élevage et de l'agroéquipement, 15-18 Mai 2014.
- Allali J. 2005. *Comparaison des structures secondaires d'ARN*. Thèse Doctorat. Université Marne-la-vallée. France. 179p.
- Allen, L., Dockrell, D. H., Pattery, T., Lee, D. G., Cornelis, P., Hellewell, P. G., et Whyte, M. K. B. (2005). Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host. *The Journal of Immunology*. **174**, 3643–3649. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3643>
- Angoujard, L. P. (2015). *Enquête sur le diagnostic et le traitement des mammites de la vache laitière par les vétérinaires de terrain en france en 2015*. Thèse Doctorat. École nationale vétérinaire d'Alfort. France. 113p.
- Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Görg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., et al. (2003). Identification of *quorum*-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology*. **5**(12), 1350–1369. <http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00532.x>

- Arnold, C., Barrett, a., Cross, L., et Magee, J. G. (2012). The use of rpoB sequence analysis in the differentiation of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*: A critical judgement in cystic fibrosis? *Clinical Microbiology and Infection*. **18**(5), E131–E133. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03785.x>
- Asnoune, Z. B., et Ouzrout, M. J. B. R. (2012). Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au nord-est de l 'Algérie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. **65**, p.5
- Auernik, K. S., Cooper, C. R., et Kelly, R. M. (2008). Life in hot acid: Pathway analyses in extremely thermoacidophilic archaea. *Curr Opin Biotechnol*. **19**(5), 445–453. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.08.001>.Life
- Bannerman, D. D., Chockalingam, A., Paape, M. J., et Hope, J. C. (2005). The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **107**(3–4), 201–215. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.04.012>
- Bardy, S. L., Ng, S. Y. M., et Jarrell, K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology*. **149**(2), 295–304. <http://doi.org/10.1099/mic.0.25948-0>
- Barreiro, J. R., Ferreira, C. R., Sanvido, G. B., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B. *et al.* (2010). Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*. **93**(12), 5661–5667. <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3614>
- Barrot Debreil, E. (2008). *Les analyses bactériologiques du lait des infections mammaires bovines applicables au cabinet vétérinaire en pratique courante et leurs intérêts dans le traitement des mammites*. Thèse Doctorat. École Nationale Vétérinaire d'Alfort. France.103p.

- Bebrone, C. (2007). Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*. **74**(12), 1686–1701. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.021>
- Benagli, C., Demarta, A., Caminada, A. P., Ziegler, D., Petrini, O., et Tonolla, M. (2012). A Rapid MALDI-TOF MS Identification Database at Genospecies Level for Clinical and Environmental *Aeromonas* Strains. *PLoS ONE*. **7**(10), 1–6. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048441>
- Benhamed, N. (2014). *Evaluation de la qualité microbiologique et sanitaire du lait cru dans la région d'Oran, Algérie : Etude du profil moléculaire virulent des Staphylococcus aureus impliquées dans les mammites bovines*. Thèse Doctorat. Université d'Oran. Algérie.
- Bensaha, H., et Arbouch, R. (2016). Impact de la dynamique de l'agriculture et ses conséquences sur la durabilité de l'écosystème saharien : cas de la vallée de M'zab (Sahara septentrional). *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.* **4**, 31–36.
- Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Müller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C. et al. (2011). A Novel Metagenomic Short-Chain Dehydrogenase /Reductase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE*. **6**(10), e26278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026278>
- Bijtenhoorn, P., Schipper, C., Hornung, C., Quitschau, M., Grond, S., Weiland, N., et Streit, W. R. (2011). BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones. *Journal of Biotechnology*. **155**(1), 86–94. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.016>
- Bizani, D., et Brandelli, A. (2001). Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir.

- Brazilian Journal of Microbiology*. **32**(4), 334–339. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400016>
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Jakobsen, T. H., Phipps, R., Nielsen, A. K., Rybtke, M. T., *et al.* (2010). *Quorum* sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*. **5**(4), 1–10.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010115>
- Bjarnsholt, T., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N., *et Givskov, M.* (2010). Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. **12**.
<http://doi.org/10.1017/S1462399410001420>
- Blondiaux, N., Gaillot, O., *et Courcol, R.-J.* (2010). MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathologie-Biologie*. **58**(1), 55—57. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.07.020>
- Boles, B. R., Thoendel, M., *et Singh, P. K.* (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*. **57**(5), 1210–1223.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04743.x>
- Bouaziz, O. (2005). *Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien*. Thèse Doctorat. Université Mentouri de Constantine. Algérie.235p.
- Bouchot, M. C., Catel, J., Chirol, C., Ganière, J. P., *et Le, M. M.* (1985). Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. *Rec. Med. Vet.* **161**, 567–577.
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., *et Haesebrouck, F.* (2009). *Quorum* sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*. **135**(3–4), 187–195.
<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.025>

- Branlant, C., Krol, A., Machatt, M. A., Pouyet, J., Ebel, J. P., Edwards, K., & Kössel, H. (1981). Primary and secondary structures of *Escherichia coli* MRE 600 23S ribosomal RNA. Comparison with models of secondary structure for maize chloroplast 23S rRNA and for large portions of mouse and human 16S mitochondrial rRNAs. *Nucleic Acids Research*, **9**(17), 4303–24.
- Bright, J. J., Claydon, M. A., Soufian, M., et Gordon, D. B. (2002). Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods*. **48**(2-3), 127–38. [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00317-7](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00317-7)
- Brooun, A., Liu, S., et Lewis, K. (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**(3), 640–646. <http://doi.org/10.1128/AAC.44.3.640-646.2000>
- Bzdrenga, J., Hiblot, J., Gotthard, G., Champion, C., Elias, M., et Chabriere, E. (2014). SacPox from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* is a proficient lactonase. *BMC Research Notes*. **7**(1), 333. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-7-333>
- Cain, T. C., Lubman, D. M., Weber, W. J., et Vertes, A. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **8**(12), 1026–1030. <http://doi.org/10.1002/rcm.1290081224>
- Callister, S. M., et Agger, W. A. (1987). Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**(2), 249–253.
- Carbonnelle, E., Beretti, J. L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., et Ferroni, A. (2007). Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

- spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**(7), 2156–2161.
<http://doi.org/10.1128/JCM.02405-06>
- Carbonnelle, É., et Nassif, X. (2011). Utilisation en routine du MALDI- TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Medecine/Sciences*. **27**(10), pp.882–888.
- Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., & Faure, D. (2003). The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(8), 4989–93. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4989-4993.2003>
- Cervinkova, D., Vlkova, H., Borodacova, I., Makovcova, J., Babak, V., Lorencova, a., *et al.* (2013). Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterinarni Medicina*. **58**(11), 567–575.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., et Connell, N. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. **69**(2), 330–339. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005.A>
- Chang, H., Zhou, J., Zhu, X., Yu, S., Chen, L., Jin, H., et Cai, Z. (2017). Strain identification and *quorum* sensing inhibition characterization of marine-derived *Rhizobium* sp. NAO1. *Royal Society Open Science*. **4**(3). <http://doi.org/10.1098/rsos.170025>
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., et Li, X. (2013). *Quorum* Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block *Quorum* Sensing-Dependent Infection. *Int. J. Mol. Sci. Int. J. Mol. Sci.* **14**, 17477–17500.
<http://doi.org/10.3390/ijms140917477>
- Chow, J. Y., Wu, L., & Yew, W. S. (2009). Directed Evolution of a Quorum-Quenching Lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 in the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry*. **48**(20), 4344–4353.
<http://doi.org/10.1021/bi9004045>

- Chow, J. Y., Xue, B., Lee, K. H., Tung, A., Wu, L., Robinson, R. C., & Yew, W. S. (2010). Directed evolution of a thermostable quorum-quenching lactonase from the amidohydrolase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40911–40920. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.177139>
- Choudhary, S., et Schmidt-Dannert, C. (2010). Applications of *quorum* sensing in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **86**(5), 1267–1279. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2521-7>
- Chowdhary, P. K., Keshavan, N., Nguyen, H. Q., Peterson, J. A., González, J. E., & Haines, D. C. (2007). *Bacillus megaterium* CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine Lactones and Acyl Homoserines [†]. *Biochemistry*. **46**(50), 14429–14437. <http://doi.org/10.1021/bi701945j>
- Christensen, L. D., Van Gennip, M., Jakobsen, T. H., Alhede, M., Hougen, H. P., Høiby, N., *et al.* (2012). Synergistic antibacterial efficacy of early combination treatment with tobramycin and *quorum*-sensing inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa* in an intraperitoneal foreign-body infection mouse model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67**(5), 1198–1206. <http://doi.org/10.1093/jac/dks002>
- Chun, C. K., Ozer, E. a., Welsh, M. J., Zabner, J., et Greenberg, E. P. (2004). From The Cover: Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa quorum*-sensing signal by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**(10), 3587–3590. <http://doi.org/10.1073/pnas.0308750101>
- Clarridge, J. E., et Alerts, C. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(4), 840–862. <http://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840>
- Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., et Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. **14**, 1584. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1196-1584>

- Couto, C., Carolina, A., Marín, C., Dubenczuk, F. C., Alvarenga, L., Botelho, B., *et al.* (2014). Verification of molecular characterization of coagulase positive *Staphylococcus* from bovine mastitis with matrix-assisted laser desorption ionization, time- offlight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) mass spectrometry. *African Journal of Microbiology Research*. **8**(48), 3861–3866. <http://doi.org/10.5897/AJMR2014.7071>
- Cryz, S. J., Pitt, T. L., Furer, E., et Germanier, R. (1984). Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. **44**(2), 508–513.
- Czajkowski, R., Krzyzanowska, D., Karczewska, J., Atkinson, S., Przysowa, J., Lojkowska, E., *et al.* (2011). Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum* sp. A44 depends on the activity of a novel class of AHL acylase. *Environmental Microbiology Reports*. **3**(1), 59–68. <http://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00188.x>
- D'argenio, D. A., Gallagher, L. A, Berg, C. A, Manoil, C., et Argenio, D. A D. (2001). *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of Bacteriology*. **183**(4), 1466–1471. <http://doi.org/10.1128/JB.183.4.1466>
- Dayhoff, M. O. (1976). The origin and evolution of protein superfamilies. *Federation Proceedings*. **35**(10), 2132–8.
- De Breven A. G. (2004). <http://www.ebgm.jussieu.fr/~debrevern/>
- Dekio, S., Yamasaki, R., Jidoi, J., Hori, H., & Osawa, S. (1984). Secondary structure and phylogeny of *Staphylococcus* and *Micrococcus* 5S rRNAs. *Journal of Bacteriology*. **159**(1), 233–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6735981>
- Del Vecchio, P., Elias, M., Merone, L., Graziano, G., Dupuy, J., Mandrich, L., *et al.* (2009). Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*. **13**(3), 461–470. <http://doi.org/10.1007/s00792-009-0231-9>

- Denning, G. M., Wollenweber, L. a, Michelle, a, Cox, C. D., Stoll, L. L., Bradley, E., et Railsback, M. A. (1998). *Pseudomonas* Pyocyanin Increases Interleukin-8 Expression by Human Airway Epithelial Cells *Pseudomonas*. **66**(12), 5777–5784.
- Dockery, J. D., et Keener, J. P. (2001). A mathematical model for *quorum* sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulletin of Mathematical Biology*. **63**(1), 95–116. <http://doi.org/10.1006/bulm.2000.0205>
- Dong, Y., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J., et Zhang, L. (2002). Identification of *Quorum*-Quenching N -Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Appli. Environ. Microbiol.* **68**(4), 1754–1759. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1754>
- Dong, Y., et Zhang, L. (2005). *Quorum* Sensing and *Quorum*-Quenching Enzymes, The Journal of Microbiology. **43**(February), 101–109.
- Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Xu, J.-L., Zhang, H.-B., Zhang, X.-F., et Zhang, L.-H. (2001). Quenching *quorum*-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*. **411**(6839), 813–817. <http://dx.doi.org/10.1038/35081101>
- Dong, Y.-H., Wang, L.-H., et Zhang, L.-H. (2007). *Quorum*-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **362**(1483), 1201–1211. <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2045>
- Draganov, D. I., et La Du, B. N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. **369**(1), 78–88. <http://doi.org/10.1007/s00210-003-0833-1>
- Drancourt, M., Bollet, C., et Raoult, D. (1997). *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**(1), 160–3. <http://doi.org/10.1099/00207713-47-1-160>
- Drancourt, M., et Raoult, D. (2002). *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**(4), 1333–8. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1333>

- Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J. L., Alvarez, a. S., *et al.* (2010). Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clinical Microbiology and Infection*. **16**(7), 998–1004. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03036.x>
- Eberl, L., et Riedel, K. (2011). Mining *quorum* sensing regulated proteins - Role of bacterial cell-to-cell communication in global gene regulation as assessed by proteomics. *Proteomics*. **11**(15), 3070–85. <http://doi.org/10.1002/pmic.201000814>
- El Behiry, A., Zahran, R. N., Tarabees, R., et Marzouk, E. (2014). Phenotypical and Genotypical Assessment Techniques for Identification of Some Contagious Mastitis Pathogens. *International Science Index*. **8**(5), 226–232. <http://doi.org/10.3844/ajmsp.2014.1.10>
- Ehresmann, C., Stiegler, P., Mackie, G. A., Zimmermann, R. A., Ebel, J. P., & Fellner, P. (1975). Primary sequence of the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, **2**(2), 265–78.
- Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Lecomte, C., Rossi, M., Masson, P., *et al.* (2007). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus* phosphotriesterase. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. **63**(7), 553–555. <http://doi.org/10.1107/S1744309107023512>
- Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Mandrich, L., Porzio, E., Moniot, S., *et al.*, E. (2008). Structural Basis for Natural Lactonase and Promiscuous Phosphotriesterase Activities. *Journal of Molecular Biology*. **379**(5), 1017–1028. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.022>

- Ernst, R. K., Hajjar, A. M., Tsai, J. H., Moskowitz, S. M., Wilson, C. B., et Miller, S. I. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *Journal of Endotoxin Research* **9**(6) 395–400.
<http://doi.org/10.1179/096805103225002764>
- Erskine, R. J. 2011. Mastitis in cattle. Merck veterinary manual. Merck Sharp and Dohme Corp, Whitehouse Station, NJ
- Estin, M. L., Stoltz, D. A., et Zabner, J. (2010). Paraoxonase 1, *Quorum* Sensing, and *P. aeruginosa* Infection: A Novel Model. In S. T. Reddy (Ed.), *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology* (pp. 183–193). Totowa, NJ: Humana Press.
http://doi.org/10.1007/978-1-60761-350-3_17
- Fenselau, C., et Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. **20**(4), 157–171.
<http://doi.org/10.1002/mas.10004>
- Filloux, A., et Vallet, I. (2003). Biofilm: mise en place et d' une communauté. *Médecine/science*. **19**(March), 77–83. <http://doi.org/10.7202/000760ar>
- Funami, J., Yoshikane, Y., Kobayashi, H., Yokochi, N., Yuan, B., Iwasaki, K., et al. (2005). 4-Pyridoxolactonase from a symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Mesorhizobium loti*: Cloning, expression, and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1753**(2), 234–239.
<http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.026>
- Gabli, A. (2005). *Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines*. Thèse Doctorat. Université Mentouri de Constantine. Algérie.
- Gallant, C. V, Raivio, T. L., Olson, J. C., Woods, D. E., et Storey, D. G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with

- altered ADP- ribosyltransferase activity and cytotoxicity, *Microbiology-Uk*. **146**(8), pp.1891–1899.
- Gambello, M. J., et Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology*. **173**(9), 3000–3009.
- Gan, H. Y., Gan, H. M., Savka, M. A., Triassi, A. J., Wheatley, M. S., Smart, L. B., *et al.* (2014). Whole-Genome Sequences of 13 Endophytic Bacteria Isolated from Shrub Willow (*Salix*) Grown in Geneva, New York. *Genome Announcements*. **2**(3), e00288–14–e00288–14. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00288-14>
- García-Contreras, R., Martínez-Vázquez, M., Velázquez Guadarrama, N., Villegas Pañeda, A. G., Hashimoto, T., Maeda, T., *et al.* (2013). Resistance to the *quorum*-quenching compounds brominated furanone C-30 and 5-fluorouracil in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Pathogens and Disease* **68**(1), 8–11. <http://doi.org/10.1111/2049-632X.12039>
- García-Contreras, R., Pérez-Eretza, B., Jasso-Chávez, R., Lira-Silva, E., Roldán-Sánchez, J. A., González-Valdez, A., *et al.* (2015). High variability in *quorum* quenching and growth inhibition by furanone C-30 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Pathogens and Disease*. **73**(6), ftv040. <http://doi.org/10.1093/femspd/ftv040>
- Gedilaghine, V. (2005). *la rationalisation du traitement des mammites en exploitation laitière conception et réalisation d'une enquête d'évaluation de la mise en place de l'action gtv partenaire dans le département de la manche*. Thèse Doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. France.
- Ghanem, M. E., Tezuka, E., Devkota, B., Izaike, Y., et Osawa, T. (2015). Persistence of uterine bacterial infection, and its associations with endometritis and ovarian function

- in postpartum dairy cows. *The Journal of Reproduction and Development*. **61**(1), 54–60. <http://doi.org/10.1262/jrd.2014-051>
- Grosso-Becerra, M.-V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J.-L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., *et al.* (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*. **15**, 318. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-318>
- Gupta, P., Chhibber, S., et Harjai, K. (2015). Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model. *Burns*. **41**(1), 153–162. <http://doi.org/10.1016/j.burns.2014.06.009>
- Hahn, H. P. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Gene*. **192**(1), 99–108. [http://doi.org/http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00116-9](http://doi.org/http://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00116-9)
- Hanafy, R. A., Couger, M. B., Baker, K., Murphy, C., O’Kane, S. D., Budd, C., *et al.* (2016). Draft genome sequence of *Micrococcus luteus* strain O’Kane implicates metabolic versatility and the potential to degrade polyhydroxybutyrates. *Genomics Data*, **9**, 148–153. <http://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.08.006>
- Handfield, M., Simard, P., et Letarte, R. (1996). Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(9), 3544–3547. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168157/>
- Heikens, E., Fleer, a, Paauw, a, Florijn, a, et Fluit, a C. (2005). Comparison of Genotypic and Phenotypic Methods for Species-Level Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**(5), 2286–2290. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2286>
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., *et al.* (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by *quorum* sensing inhibitors. *The EMBO Journal*. **22**(15), 3803–3815. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg366>

- Hiblot, J. (2013). *Amélioration rationalisée de l'enzyme hyperthermostable SsoPox*. Thèse Doctorat. Université d'Aix-Marseille. France.
- Hiblot, J., Gotthard, G., Chabriere, E., et Elias, M. (2012a). Characterisation of the organophosphate hydrolase catalytic activity of SsoPox. *Scientific Reports*. **2**, 779. <http://doi.org/10.1038/srep00779>
- Hiblot, J., Gotthard, G., Chabriere, E., et Elias, M. (2012b). Structural and Enzymatic characterization of the lactonase SisLac from *Sulfolobus islandicus*. *PLoS ONE*. **7**(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047028>
- Hiblot, J., Gotthard, G., Elias, M., et Chabriere, E. (2013). Differential Active Site Loop Conformations Mediate Promiscuous Activities in the Lactonase SsoPox. *PLoS ONE*. **8**(9), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0075272>
- Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., et Lay, Jr, J. O. (1996). Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **10**(10), 1227–1232. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960731\)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960731)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6)
- Hossain, M., Saha, S., Rahman, M., Singha, J., et Mamun, A. (2013). Isolation, Identification and AntibioGram Study of *Pseudomonas Aeruginosa* from Cattle in Bangladesh. *Journal of Veterinary Advances*. **3**(7), 1. <http://doi.org/10.5455/jva.20130717123841>
- Hosseinzadeh, S., et Saei, H. D. (2014). Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran : Emerging of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. **2**(1), pp.27–34.
- Hraiech, S., Hiblot, J., Lafleur, J., Lepidi, H., Papazian, L., Rolain, J.-M., et al. (2014). Inhaled Lactonase Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Mortality

- in Rat Pneumonia. *PLoS ONE*. **9**(10), e107125.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0107125>
- Huang, J. J., Han, J.-I., Zhang, L.-H., & Leadbetter, J. R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(10), 5941–9. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5941-5949.2003>
- Huang, J. J., Petersen, A., Whiteley, M., & Leadbetter, J. R. (2006). Identification of QuiP, the Product of Gene PA1032, as the Second Acyl-Homoserine Lactone Acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**(2), 1190–1197. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1190-1197.2006>
- Huang, W., Lin, Y., Yi, S., Liu, P., Shen, J., Shao, Z., & Liu, Z. (2012). QsdH, a Novel AHL Lactonase in the RND-Type Inner Membrane of Marine *Pseudoalteromonas* *byunsanensis* Strain 1A01261. *PLoS ONE*. **7**(10), e46587.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046587>
- Janda, J. M., et Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**(9), 2761–2764. <http://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., et Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*. **76**(1), 46–65.
<http://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>
- Juan, V., & Wilson, C. (1999). RNA Secondary Structure Prediction Based on Free Energy and Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology*. **289**(4), 935–947.
<http://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2801>

- Kalia, V. C. (2015). *Quorum sensing vs Quorum quenching: A battle with no end in sight*. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with no end in Sight*. Springer Delhi. 383p. <http://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8>
- Khalilzadeh, P. (2009). *Formation de Biofilm à Pseudomonas aeruginosa: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing*. Thèse Doctorat. Université Paul Sabatier. Toulouse. France.
- Khersonsky, O., et Tawfik, D. S. (2005). Structure–Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest that Its Native Activity Is Lactonase. *Biochemistry*. **44**(16), 6371–6382. <http://doi.org/10.1021/bi047440d>
- Knippenberg, V., et C.W.Hilbers. (1986). *Structure and Dynamics of RNA*. Plenum Press NewYork. 333p.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., et Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*. **182**(21), 5990–5996. <http://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000>
- Kouza, M., Faraggi, E., Kolinski, A., et Kloczkowski, A. (2017). The GOR Method of Protein Secondary Structure Prediction and Its Application as a Protein Aggregation Prediction Tool (pp. 7–24). Humana Press, New York, NY. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-6406-2_2
- Krishnamurthy, T., Rajamani, U., et Ross, P. L. (1996). Detection of Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria by Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **10**(8),883-888. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960610\)10:8<883::AID-RCM594>3.0.CO;2-V](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960610)10:8<883::AID-RCM594>3.0.CO;2-V)
- Krysciak, D., Schmeisser, C., Preuß, S., Riethausen, J., Quitschau, M., Grond, S., & Streit, W. R. (2011). Involvement of Multiple Loci in Quorum Quenching of Autoinducer I

- Molecules in the Nitrogen-Fixing Symbiont *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. Strain NGR234. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(15), 5089–5099.
<http://doi.org/10.1128/AEM.00112-11>
- Küpfer, M., Kuhnert, P., Korczak, B. M., Peduzzi, R., et Demarta, A. (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **56**(12), 2743–2751. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.63650-0>
- Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. a G., et Rooijackers, S. H. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **188**(1), 386–93. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>
- Lamy, B., Kodjo, A., et Laurent, F. (2017). Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **71**(1), 1–5.
<http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.04.014>
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., et Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*. **10**(12), 599–606.
<http://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
- Lay, J. O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews*. **20**(4), 172–194. <http://doi.org/10.1002/mas.10003>
- Le Berre, R., Faure, K., Nguyen, S., Pierre, M., Ader, F., et Guery, B. (2006). Quorum sensing : une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **36**(7), 349–357. <http://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.01.008>
- Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Ader, F., et al. (2008). Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic

- isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. **14**(4), 337–343. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01925.x>
- Leadbetter, J. R., et Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone *Quorum*-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus* These include: Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone *Quorum*-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology*. **182**(24), 6921–6926. <http://doi.org/10.1128/JB.182.24.6921-6926.2000>.
- Lecouste-Philipps A. (2006). *Extraction de contraintes structurales à partir de comparaisons de séquences et de structures tridimensionnelles d'ARN*. Thèse Doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg. France. 190p.
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., et al. (2013). A cell-cell communication signal integrates *quorum* sensing and stress response. *Nat Chem Biol*. **9**(5), 339–343. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- Lee, J., et Zhang, L. (2014). The hierarchy *quorum* sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*. **6**(1), 26–41. <http://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Leontis, N., Stombaugh, J., et Westhof, E. (2002). Motif prediction in ribosomal RNAs Lessons and prospects for automated motif prediction in homologous RNA molecules. *Biochimie*. **84**(9), 961–973. [http://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01463-3](http://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01463-3)
- Lin, Y.-H., Xu, J.-L., Hu, J., Wang, L.-H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., & Zhang, L.-H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology*. **47**(3), 849–60.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Qin, J., Siederdisen, C. H. zu, Tanzer, A., Amman, F., et al. (2013). 2D Meets 4G: G-Quadruplexes in RNA Secondary Structure Prediction. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. **10**(4), 832–844. <http://doi.org/10.1109/TCBB.2013.7>

- Low, J. T., & Weeks, K. M. (2010). SHAPE-directed RNA secondary structure prediction. *Methods (San Diego, Calif.)*, **52**(2), 150–8. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.06.007>
- Lusvarghi, S., Sztuba-Solinska, J., Purzycka, K. J., Rausch, J. W., & Le Grice, S. F. J. (2013). RNA secondary structure prediction using high-throughput SHAPE. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (75), e50243. <http://doi.org/10.3791/50243>
- MADR ,2011. Ministère de l'agriculture et de développement rural.
- Mahami, T., et Adu-Gyamfi, A. (2011). Biofilm-associated infections: public health implications. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)*. **2**(10), 2141–5463. <http://www.interestjournals.org/IRJM>
- Maly, P., & Brimacombe, R. (1983). Refined secondary structure models for the 16S and 23S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. **11**(21), 7263–86.
- Mandrich, L., Merone, L., et Manco, G. (2010). Hyperthermophilic phosphotriesterases/lactonases for the environment and human health. *Environmental Technology*. **31**(10), 1115–1127. <http://doi.org/10.1080/09593331003789529>
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*. **56**, 289–314. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>
- Marques, J. C., Lamosa, P., Russell, C., Ventura, R., Maycock, C., Semmelhack, M. F., *et al.* (2011). Processing the Interspecies Quorum-sensing Signal Autoinducer-2 (AI-2). *Journal of Biological Chemistry*. **286**(20), 18331–18343. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.230227>
- McClure, D. C., et Schiller, L. N. (1996). Inhibition of Macrophage Phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids In Vitro and In Vivo. *Current Microbiology*. **33**(2), 109–117. <http://doi.org/10.1007/s002849900084>
- Mei, G.-Y., Yan, X.-X., Turak, A., Luo, Z.-Q., & Zhang, L.-Q. (2010). AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-

- acylhomoserine lactonase. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**(15), 4933–42. <http://doi.org/10.1128/AEM.00477-10>
- Mekibib, B., Furgasa, M., Abunna, F., Megersa, B., et Regassa, A. (2010). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and major pathogens in dairy farms of holeta town, central Ethiopia. *Veterinary World*. **3**(9), 397–403. <http://doi.org/10.5455/vetworld.2010.397-403>
- Mellmann, A., Becker, K., von Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P., et Harmsen, D. (2006). Sequencing and Staphylococci Identification. *Emerging Infectious Diseases*. **12**(2), 333–336.
- Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., et Manco, G. (2005). A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties. *Extremophiles*. **9**(4), 297–305. <http://doi.org/10.1007/s00792-005-0445-4>
- Miyayama, Y., Kaneko, Y., Yanagihara, K., Morohoshi, T., Morinaga, Y., Nakamura, S., et al. (2013). Efficacy of AiiM, an N-acylhomoserine lactonase, against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model of acute pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **57**(8), 3653–3658. <http://doi.org/10.1128/AAC.00456-13>
- Miyashiro, T., et Ruby, E. G. (2012). Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*. **84**(5), 795–806. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x>
- Miyazaki, S., Matsumoto, T., Tateda, K., et Ohno, A. (1995). Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *Society*. **43**(1995), 169–175. <http://doi.org/10.1099/00222615-43-3-169>
- Moghaddam, M. M., Khodi, S., et Mirhosseini, A. (2014). Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology: Open Access*. **03**(04), 1–10. <http://doi.org/10.4172/2327-5073.1000156>

- Mollet, C., Drancourt, M., et Raoult, D. (1997). rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology*. **26**(5), 1005–1011. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6382009.x>
- Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., et Ikeda, T. (2008). Identification and Characterization of N -Acylhomoserine Lactone-Acylase from the Fish Intestinal *Shewanella* sp. Strain MIB015. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **72**(7), 1887–1893. <http://doi.org/10.1271/bbb.80139>
- Morohoshi, T., Tominaga, Y., Someya, N., & Ikeda, T. (2012). Complete genome sequence and characterization of the N-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **113**(1), 20–25. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.006>
- Mukherji, R., Varshney, N. K., Panigrahi, P., Suresh, C. G., & Prabhune, A. (2014). A new role for penicillin acylases: Degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Enzyme and Microbial Technology*. **56**, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.12.010>
- Newman, K. L., Chatterjee, S., Ho, K. A., & Lindow, S. E. (2008). Virulence of Plant Pathogenic Bacteria Attenuated by Degradation of Fatty Acid Cell-to-Cell Signaling Factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **21**(3), 326–334. <http://doi.org/10.1094/MPMI-21-3-0326>
- Ng, F. S. W., Wright, D. M., et Seah, S. Y. K. (2011). Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and its immobilization for disruption of *quorum* sensing. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(4), 1181–1186. <http://doi.org/10.1128/AEM.01642-10>
- Nicodème, M., Grill, J. P., Humbert, G., et Gaillard, J. L. (2005). Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: Dependence of proteolytic activity on

- culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*. **99**(3), 641–648.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02634.x>
- Noireterre, P. (2006). *suivis de comptages cellulaires et d'examens bacteriologiques lors de mammites cliniques chez la vache laitiere. Etude experimentale au centre d'elevage lucien bizet de poisy*. Thèse Doctorat.Université Claude-Bernard - Lyon I.France.
- Nussinov, R., et Jacobson, A. B. (1980). Fast algorithm for predicting the secondary structure of single-stranded RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **77**(11), 6309–13.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6161375>
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Maher, Y., Denning, G. M., Britigan, B. E., *et al.* (2006). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **522**(4), 1077–1086. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00198.2003>
- O'Toole, G. A., et Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. **30**(2), 295–304. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Organisation mondiale de la santé. (2017). Centre des médias. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/fr/> consulté octobre 2017.
- Ouchriah, Y., Heleili, N., Mamache, B., Ayachi, A., et Kassah, A. (2015). Antimicrobial sensitivity of bacterial strains isolated from newborn calves in the abattoir of Batna (Algeria). *International Journal of Livestock Research*. **5**(2),1
<http://doi.org/10.5455/ijlr.20150205040450>
- Ozer, E. A., Pezzulo, A., Shih, D. M., Chun, C., Furlong, C., Lulis, A. J., *et al.* (2005). Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*. **253**(1), 29-37.

- <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.023>
- Palani Kumar, M., Vairamani, M., Prasada Raju, M., Lobo, C., Anbumani, N., Girish Kumar, C. P., *et al.* (2004). Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. *Indian Journal of Medical Research*. **119**(6), 283–288.
- Parez, M. (1985). The most important genital diseases of cattle (control , treatment and the hygiene of semen collection), **4**(September 1984), 69–87.
- Park, H., Hong, M., Hwang, S., Park, Y., Kwon, K., Yoon, J., *et al.* (2013). Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis. *Acta Veterinaria Hungarica*. **62**(1), 1–12. <http://doi.org/10.1556/AVet.2013.054>
- Park, S., Kang, H., Jang, H., Koo, B., Yum, D., & Lee, J. (2005). Identification of Extracellular N -Acylhomoserine Lactone Acylase from a *Streptomyces* sp . and Its Application to Quorum Quenching. **71**(5), 2632–2641. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2632>
- Park, S.-Y., Lee, S. J., Oh, T.-K., Oh, J.-W., Koo, B.-T., Yum, D.-Y., & Lee, J.-K. (2003). AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*. **149**(6), 1541–1550. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26269-0>
- Pearson, J. P., et Delden, C. V. a N. (1999). Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *Society*. **181**(4), 1203–1210.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, a, Iglewski, B. H., et Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**(1), 197–201. <http://doi.org/10.1073/pnas.91.1.197>

- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., et Greenberg, E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**(February), 1490–1494. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1490>
- Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, a. S., Greenberg, E. P., et Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **96**(20), 11229–11234. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., et Iglewski, B. H. (1997). Regulation of las and rhl *quorum* sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Strain*. **179**(10), 3127–3132. <http://doi.org/10.3127-3132>
- Pieper, U., Eswar, N., Braberg, H., Madhusudhan, M. S., Davis, F. P., Stuart, A. C. *et al.* (2004). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Research*, **32**(90001), 217D–222. <http://doi.org/10.1093/nar/gkh095>
- Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supré, K., Braem, G., Van Nuffel, A., *et al.* (2011). Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*. **94**(6), 2933–44. <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3956>
- Pipas, J. M., et McMahon, J. E. (1975). Method for predicting RNA secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **72**(6), 2017–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1056009>
- Popat, R., Crusz, S. a., et Diggle, S. P. (2008). The social behaviours of bacterial pathogens. *British Medical Bulletin*. **87**(1), 63–75. <http://doi.org/10.1093/bmb/ldn030>
- Pukatzki, S., Kessin, R. H., et Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba

- Dictyostelium discoideum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**(5), 3159–64. <http://doi.org/10.1073/pnas.052704399>
- Pyörälä, S., et Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. **134**(1-2), 3–8.
<http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>
- Pustelny, C., Albers, A., Büldt-Karentzopoulos, K., Parschat, K., Chhabra, S. R., Cámara, M., *et al.* (2009). Dioxygenase-Mediated Quenching of Quinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*. **16**(12), 1259–1267. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.11.013>
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Arundel, J. H., et Blood, D. C. (2000). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. Saunders. 1877p.
- Rakotozandrindrainy, R., et Foucras, G. (2007). Etiologie bactérienne des mammites des vaches laitières du triangle laitier des hautes terres de Madagascar. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **158**(2), 106–110.
- Randall, L. P., Lemma, F., Koylass, M., Rogers, J., Ayling, R. D., Worth, D., *et al.* (2015). Evaluation of MALDI-ToF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory. *Research in Veterinary Science*. **101**(September), 42–49. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.018>
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., et El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* : A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*. **2015**, 1–17.
<http://doi.org/doi.org/10.1155/2015/759348>
- Rasmussen, T. B., et Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*. **296**(2–3), 149–161.
<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>

- Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V. *et al.* (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*. **148**(4), 923–932. <http://doi.org/10.1099/00221287-148-4-923>
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., et Petti, C. A. (2007). Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. **44**(8), 1108–1114. <http://dx.doi.org/10.1086/512818>
- Remy, B., Plener, L., Elias, M., Daudé, D., et Chabrière, E. (2016). Des enzymes pour bloquer la communication bactérienne, une alternative aux antibiotiques??? *Annales Pharmaceutiques Françaises*. **74**(6), 413-420. <http://doi.org/10.1016/j.pharma.2016.06.005>
- Rémy, D. (2010). *Les mammites*. France agricole. 259 p.
- Renvoisé, A. (2012). *Applicabilité de la PCR « universelle » 16S comme outil d'identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie*. Thèse Doctorat. Université Aix-Marseille. France.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., & Faure, D. (2008). A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environmental Microbiology*. **10**(3), 560–570. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01475.x>
- Rinaldi, M., Li, R. W., Bannerman, D. D., Daniels, K. M., Evoke-Clover, C., Silva, M. V. B., *et al.* (2010). A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Functional {et} Integrative Genomics*. **10**(1), 21–38. <http://doi.org/10.1007/s10142-009-0133-z>
- Romero, M., Diggle, S. P., Heeb, S., Cárjara, M., & Otero, A. (2008). *Quorum* quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase.

- FEMS Microbiology Letters*. **280**(1), 73–80. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01046.x>
- Rong, X., et Huang, Y. (2014). Multi-locus sequence analysis. Taking prokaryotic systematics to the next level. *Methods in Microbiology*. **41**, 221–251. <http://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.10.001>
- Roy, V., Fernandes, R., Tsao, C.-Y., & Bentley, W. E. (2010). Cross Species *Quorum* Quenching Using a Native AI-2 Processing Enzyme. *ACS Chemical Biology*. **5**(2), 223–232. <http://doi.org/10.1021/cb9002738>
- Santos, J., Risso, V. A., Sica, M. P., & Ermácora, M. R. (2007). Effects of serine-to-cysteine mutations on beta-lactamase folding. *Biophysical Journal*, **93**(5), 1707–18 <http://doi.org/10.1529/biophysj.106.103804>
- Schabauer, L., Wenning, M., Huber, I., et Ehling-Schulz, M. (2014). Novel physico-chemical diagnostic tools for high throughput identification of bovine mastitis associated gram-positive, catalase-negative cocci. *BMC Veterinary Research*. **10**(1), 156 <http://doi.org/10.1186/1746-6148-10-156>
- Schaefer, a L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., et Greenberg, E. P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in *quorum* sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**(18), 9505–9509. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9505>
- Schalm, O. W., Carrol, E. J., et Jain, N. C. (1971). *Bovine Mastitis*. Philadelphia, PA: Lea et Febiger.372p.
- Seed, P. C., Passador, L., et Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of Bacteriology*. **177**(3), 654–659.

- Seegers, H., Ménard, J. L., et Fourichon, C. (1997). Mammites en élevage bovin laitier : importance actuelle, épidémiologie et plans de prévention. *Rencontres Rech. Ruminants*. **4**, 233–242.
- Shepherd, R. W., & Lindow, S. E. (2009). Two Dissimilar N-Acyl-Homoserine Lactone Acylases of *Pseudomonas syringae* Influence Colony and Biofilm Morphology. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**(1), 45-53. <http://doi.org/10.1128/AEM.01723-08>
- Seidler, N. W. (2013). *GAPDH: Biological Properties and Diversity*. Springer. New York London. ISBN : 978-94-007-4716-6. 293p.
- Seker, E., Kuyucuolu, Y., et Selahattin, K. (2009). Bacterial examinations in the nasal cavity of apparently healthy and unhealthy Holstein cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advance*. **8**(11), 2355 – 2359.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J. M., et Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*. **49**(4), 543–551. <http://doi.org/10.1086/600885>
- Sethupathy, S., Prasath, K. G., Ananthi, S., Mahalingam, S., Balan, S. Y., et Pandian, S. K. (2016). Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production. *Journal of Proteomics*. **145**, 112–126. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.019>
- Shin, H. B., Yoon, J., Lee, Y., Kim, M. S., et Lee, K. (2015). Comparison of maldi-tof ms, housekeeping gene sequencing, and 16s rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Medical Journal*. **56**(2), 550–555. <http://doi.org/10.3349/ymj.2015.56.2.550>

- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M., et Parsek, M. R. (2006). The impact of *quorum* sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*. **62**(5), 1264–1277. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x>
- Simpson, D. a, Ramphal, R., et Lory, S. (1992). adherence : distinct genetic loci control Genetic Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Adherence : Distinct Genetic Loci Control Attachment to Epithelial Cells and Mucins. *Infection and Immunity*. **60**(9), 3771–3779.
- Singh, V., & Somvanshi, P. (2009). Computational modeling analyses of RNA secondary structures and phylogenetic inference of evolutionary conserved 5S rRNA in the prokaryotes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **27**(7), 770–776. <http://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2008.11.012>
- Smith, R. S., Kelly, R., Iglewski, B. H., et Phipps, R. P. (2002). The *Pseudomonas* autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **169**(5), 2636–2642. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2636>
- Soler, L., Yáñez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalán, V., Figueras, M. J., et Martínez-Murcia, A. J. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54**(5),1511/19
- Spanu, T., De Carolis, E., Fiori, B., Sanguinetti, M., D’Inzeo, T., Fadda, G., et Posteraro, B. (2011). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to rpoB gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. **17**(1), 44–49. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03181.x>

- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P., et Kaper, J. B. (2003). Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(15), 8951–8956. <http://doi.org/10.1073/pnas.1537100100>
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, a L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**(6799), 959–964. <http://doi.org/10.1038/35023079>
- Suarez, S. (2013). *Microbiologie clinique et spectrométrie de masse*. Thèse Doctorat. Université Paris Descartes. France.
- Suter, S. (1994). The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **150**(6 II). http://doi.org/10.1164/ajrccm/150.6_Pt_2.S118
- Sztachańska, M., Barański, W., Janowski, T., Pogorzelska, J., et Zduńczyk, S. (2016). Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. **19**(1), 119–124. <http://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0015>
- Tahi F. (2014). *Bioinformatique des ARNs non-codants : Algorithmes pour leur identification et la prédiction de leur structure*. Thèse d'Habilitation. Université d'Evry-Val d'Essonne. 84p.
- Takahashi, T., Kaneko, M., Mori, Y., Tsuji, M., Kikuchi, N., & Hiramune, T. (1997). Phylogenetic analyses of *Staphylococcus* based on the 16S rDNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **59**(9), 775–83.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., et Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28**(10), 2731–2739. <http://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

- Tenhagen, B., Köster, G., Wallmann, J., et Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*. **89**(7), 2542–51.
[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72330-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X)
- Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S., Vasil, A. I., et Vasil, M. L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* Hemolytic Phospholipase C Suppresses Neutrophil Respiratory Burst Activity. *Infection and Immunity*. **67**(5), 2371–2376.
- Terwagne, M., Mirabella, A., Lemaire, J., Deschamps, C., De Bolle, X., & Letesson, J.-J. (2013). Quorum Sensing and Self-Quorum Quenching in the Intracellular Pathogen *Brucellamelitensis*. *PLoS ONE*. **8**(12), e82514.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082514>
- Tewari, D., Cieply, S., et Livengood, J. (2011). Identification of bacteria recovered from animals using the 16S ribosomal RNA gene with pyrosequencing and Sanger sequencing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* **23**(6), 1104–8
<http://doi.org/10.1177/1040638711425583>
- Tomazi, T., Goncalves, J. L., Barreiro, J. R., Braga, P. a. D. C., Prada e Silva, L. F., Eberlin, M. N., et dos Santos, M. V. (2014). Identification of Coagulase-Negative Staphylococci from Bovine Intramammary Infection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. **52**(5), 1658–1663. <http://doi.org/10.1128/JCM.03032-13>
- Uroz, S., Chhabra, S. R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P., et Dessaux, Y. (2005). N-acylhomoserine lactone *quorum*-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology*. **151**(10), 3313–3322. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27961-0>

- Uroz, S., Oger, P. M., Chapelle, E., Adeline, M.-T., Faure, D., & Dessaux, Y. (2008). A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**(5), 1357–66. <http://doi.org/10.1128/AEM.02014-07>
- Van Veen, S. Q., Claas, E. C. J., et Kuijper, E. J. (2010). High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**(3), 900–907. <http://doi.org/10.1128/JCM.02071-09>
- Vasil, M. L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *The Journal of Pediatrics*. **108**(5), 800–805. [http://doi.org/10.1016/S0022-3476\(86\)80748-X](http://doi.org/10.1016/S0022-3476(86)80748-X)
- Vasil, M. L., Stonehouse, M. J., Vasil, A. I., Wadsworth, S. J., Goldfine, H., Bolcome, R. E., et Chan, J. (2009). A complex extracellular sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. *PLoS Pathogens*. **5**(5). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000420>
- Voet, D., & Voet, J. G. (2011). *Biochemistry*. John Wiley & Sons. ISBN : 978-2-8041-7101-8. pp :607-610.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P., et Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. **187**(13), 4372–80. <http://doi.org/10.1128/JB.187.13.4372-4380.2005>
- Wahjudi, M., Papaioannou, E., Hendrawati, O., van Assen, A. H. G., van Merkerk, R., Cool, R. H., et al. (2011). PA0305 of *Pseudomonas aeruginosa* is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. *Microbiology*. **157**(7), 2042–2055. <http://doi.org/10.1099/mic.0.043935-0>

- Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J., et Kasai, H. (2007). Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **57**(8), 1846–1850. <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.646850>
- Wang, W.-Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N., & Ikeda, T. (2010). AiiM, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**(8), 2524–30. <http://doi.org/10.1128/AEM.02738-09>
- Wang, W.-Z., Morohoshi, T., Someya, N., & Ikeda, T. (2012). AidC, a novel N-acylhomoserine lactonase from the potato root-associated cytophaga-flavobacteria-bacteroides (CFB) group bacterium *Chryseobacterium* sp. strain StRB126. *Applied and Environmental Microbiology*. **78**(22), 7985–92. <http://doi.org/10.1128/AEM.02188-12>
- Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., Von Bodman, S. B., et Churchill, M. E. A. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Molecular Cell*. **9**(3), 685–694. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00480-X](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00480-X)
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. a, Lane, D. J., Pelletier, D. a., et Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. **173**(2), 697–703. <http://doi.org/n.a>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. **51**(2), 221–271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/>
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., et al. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and

- environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**(14), 8484–8489. <http://doi.org/10.1073/pnas.0832438100>
- Won, Y. S., Kwon, H. J., Oh, G. T., Kim, B. H., Lee, C. H., Park, Y. H., ... Choi, Y. K. (2002). Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-Nos2(tm1Lau) mice with dermatitis. *Microbiology and Immunology*. **46**(9), 629–32.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Molin, S., Givskov, M., et Høiby, N. (2004). Synthetic furanones inhibit *quorum*-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **53**(6), 1054–1061. <http://doi.org/10.1093/jac/dkh223>
- Yáñez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J., et Martínez-Murcia, A. J. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**(3), 875–883.
- Youssef, A. I., et Mohamed, S. E. (2015). Raw Milk as a Potential Source of Some Zoonotic Bacterial Diseases in Ismailia, Egypt. *Global Veterinaria*. **14**(6), 824–829. <http://doi.org/10.5829/idosi.gv.2015.14.06.95107>
- Zuker, M., et Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research*. **9**(1), 133–48.

Annexes

Annexe A

REPARTITION PAR ELEVAGE DU NOMBRE D'ANIMAUX ET DU NOMBRE DE QUARTIERS TESTES PAR CMT

1/ Prélèvements effectués à Constantine : Les prélèvements ont été effectués sur six vaches (Test CMT réalisé sur les 24 quartiers, 11 étaient positifs).

Tableau complémentaire 1 : Cas de mammites subcliniques dans la région de Constantine, ferme pilote d'El-Baaraouia- El-Khroub

N° Vache	Description
33176 PG C4	Cocci Gram positif
65641 PG C7	Bacille Gram négatif
7011 PG C8	Cocci gram positif
4543 PD C10	Bacille Gram négatif
65641 PD C12	Cocci Gram positif
66162 PG C13	Bacille Gram négatif
65641 AD	Cocci Gram positif
4543 PG	Cocci Gram positif
65641 AG	Cocci Gram positif
505 PG	Cocci Gram positif
66162 PD	Cocci Gram positif

P: Postérieur A : Antérieur

D : Droit G : Gauche

2/ Prélèvements effectué à Batna : Les prélèvements ont été effectués sur huit vaches (Test CMT réalisé sur les 32 quartiers, 15 étaient positifs).

Tableau complémentaire 2 : Cas des mammites sub-clinique dans la région de Batna, Djerma

N° Vaches	Description
69482 AG B1	Cocci Gram positif
69482 PD B2	Cocci Gram positif
05991 AG B3	Cocci Gram positif
05993 PG B5	Cocci Gram positif
23553 PD B6	Cocci Gram positif
23552 PD B9	Cocci Gram positif
06112011 AG B11	Cocci Gram positif
23586 PD B14	Cocci Gram positif
05993 PD	Cocci Gram positif
05993 AG	Cocci Gram positif
69482 PG	Cocci Gram positif
23553 AD	Cocci Gram positif
23586 AD	Cocci Gram positif
21112010 PD	Cocci Gram positif
05993 AD	Cocci Gram positif

Annexe C

RESULTATS DU BLASTN DES SEQUENCES NUCLEIQUES

Tableau complémentaire 3 : Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank des 14 séquences d'ADNr 16S

Code Echantillon	Nom du BLAST	N° Genbank	% couverture	% identité	E-value
1 Batna	<i>Staphylococcus cohnii</i>	emb AJ717378.1 	99%	100%	0,0
2 Batna	<i>Micrococcus luteus</i>	gb EU438932.1 	100%	99,80%	0,0
3 Batna	<i>Staphylococcus hominis</i>	gb FJ768458.1 	99%	99,80%	0,0
4 Constantine	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ref NR_074994.1 	99%	99,86%	0,0
5 Batna	<i>Staphylococcus hominis</i>	gb FJ768458.1 	99%	99,8%	0,0
6 Batna	<i>Staphylococcus hominis</i>	emb AJ717375.1 	99%	99,93%	0,0
7 Constantine	<i>Escherichia coli</i>	gb CP002729.1 	99%	99,93%	0,0
8 Constantine	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	dbj AP008934.1 	99%	99,87%	0,0
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	gb GQ222240.1 	99%	99,74%	0,0
9 Batna	<i>Micrococcus luteus</i>	gb EU438932.1 	100%	99,93%	0,0
10 Constantine	<i>Escherichia coli</i>	emb FN649414.1 	99%	99,87%	0,0
11 Batna	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	dbj AP006716.1 	100%	100%	0,0
12 Constantine	<i>Staphylococcus equorum</i>	ref NR_041926.1 	99%	99,93%	0,0
13 Constantine	<i>Aeromonas salmonicida</i>	gb AY910844.1 	99%	99,66%	0,0
14 Batna	<i>Staphylococcus hominis</i>	gb FJ768458.1 	99%	99,80%	0,0

Tableau complémentaire 4 : Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank des 12 séquences du gène *rpoB*.

Code Echantillon	Non du BLAST	N° Genbank	% identité	% couverture	E-value
1 Batna	<i>Staphylococcus cohnii</i>	gb KF113479.1 	99,76 %	88 %	0,0
3 Batna	<i>Staphylococcus hominis</i>	gb KF113483.1 	98,92 %	88 %	0,0
4 Constantine	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	dbj AP006716.1 	95,37 %	100 %	0,0
6 Batna	<i>Staphylococcus hominis</i>	gb KF113483.1 	100 %	100 %	0,0
7 Constantine	<i>Escherichia coli</i>	gb CP006584.1 	100 %	100 %	0,0
8 Constantine	<i>Staphylococcus xylosus</i>	LN554884.1	96,05 %	100 %	0,0
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	AP008934.1	90,38 %	100 %	0,0
10 Constantine	<i>Escherichia coli</i>	emb HG738867.1 	100 %	100 %	0,0
11 Batna	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	dbj AP006716.1 	100 %	100 %	0,0
12 Constantine	<i>Staphylococcus equorum</i>	gb KF113481.1 	100 %	100 %	0,0
14 Batna	<i>Staphylococcus hominis</i>	gb KF113483.1 	98,92%	99 %	0,0

Annexe D

ALIGNEMENTS DES DIFFERENTES SEQUENCES NUCLEIQUES ET PROTEIQUES
REALISES AVEC CLUSTALW

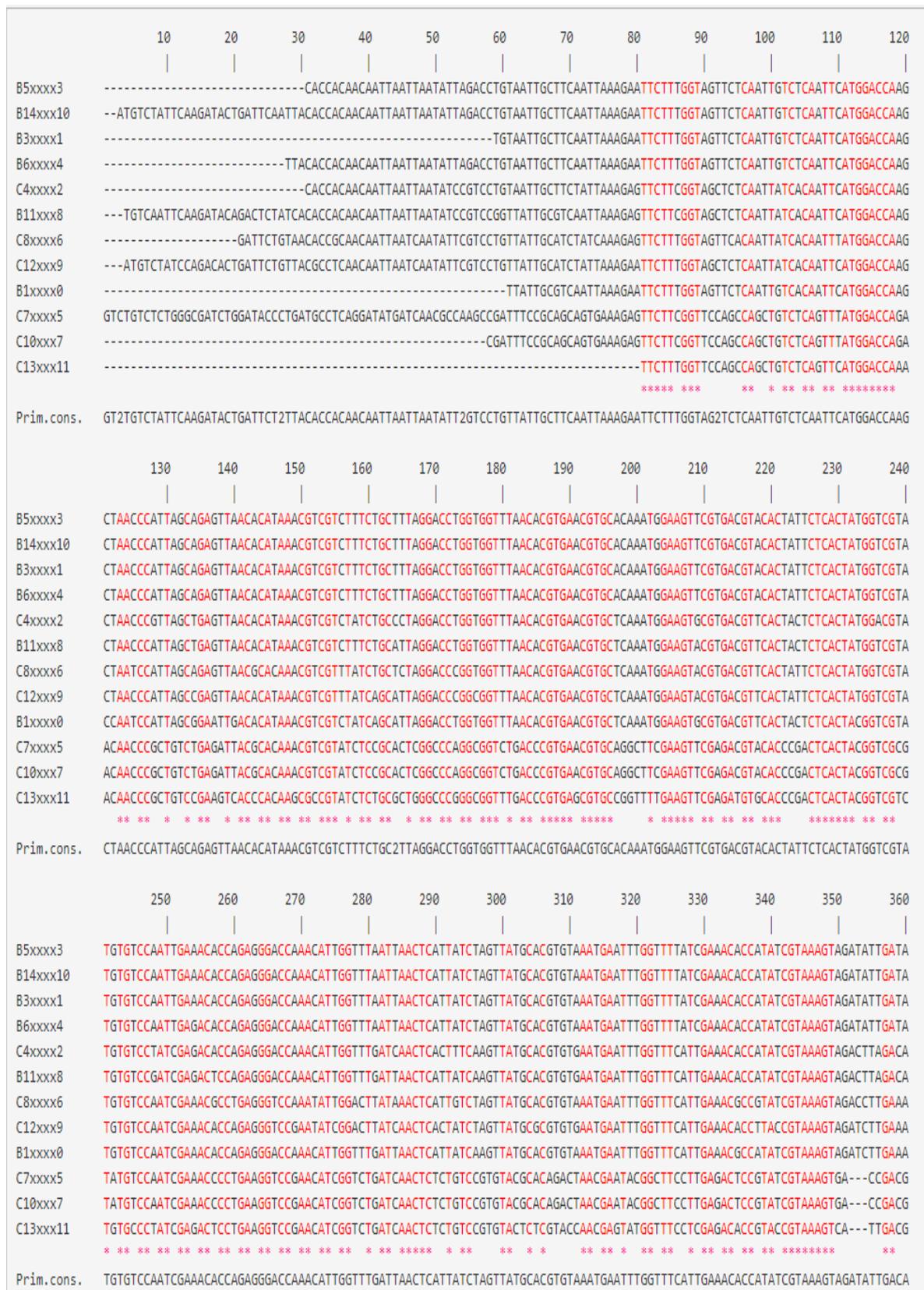
Alignement multiple des séquences *ADNr 16S* des 14 isolats.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	
B2xxxx1	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
B9xxxx2	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
B1xxxx0	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
C12xxx5	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
C8xxxx9	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
B6xxxx8	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
B14xxx13	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
B5xxxx7	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
B3xxxx3	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
C4xxxx4	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
B11xxx6	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
C7xxxx10	TGATCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
C10xxx11	TGATCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
C13xxx12	TGATCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
Prim. cons.	TGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTCTAAACATGCAAGTCGAAGC--A--TGAAGCCAGCTTGGTGGG---TTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGA															
		160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
B2xxxx1	AAC TGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAGAT-----TTACGGTGGTGGATGGATCGCGGCTATCAGCTTGGTGGTGAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
B9xxxx2	AAC TGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAGAT-----TTACGGTGGTGGATGGATCGCGGCTATCAGCTTGGTGGTGAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
B1xxxx0	AAC CGGGCTAATCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
C12xxx5	AAC CGGGCTAATCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
C8xxxx9	AAC CGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
B6xxxx8	AAC CGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
B14xxx13	AAC CGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
B5xxxx7	AAC CGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
B3xxxx3	AAC CGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
C4xxxx4	AAC CGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
B11xxx6	AAC CGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGG															
C7xxxx10	AAC GGTAGCTAATACCGATAAACGTCGCAAGCAAAAGAGGGGACCTTCGGGCC-----TCTGCCATCGGATGTCGCCAGATGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGCTGAGAGG															
C10xxx11	AAC GGTAGCTAATACCGATAAACGTCGCAAGCAAAAGAGGGGACCTTCGGGCC-----TCTGCCATCGGATGTCGCCAGATGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGCTGAGAGG															
C13xxx12	AAC GACTGCTAATACCGATACGCCCTACGGGGAAAAGAGGGGACCTTCGGGCC-----TTTCCGATGGATGAACCCAGGTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGCTGAGAGG															
Prim. cons.	AACCGGAGCTAATACCGGATAAATTTGAACCGCATGTTCTAAAGTAAAGATGGTTTGTCTACCTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTAAAGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGCTGAGAGG															
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450
B2xxxx1	GTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGACGCGCGGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGGAAGAA															
B9xxxx2	GTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGACGCGCGGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGGAAGAA															
B1xxxx0	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
C12xxx5	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
C8xxxx9	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
B6xxxx8	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
B14xxx13	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
B5xxxx7	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
B3xxxx3	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
C4xxxx4	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
B11xxx6	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															
C7xxxx10	ATGACAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGACATGCCCGGTGATGAAGAAAGGCTTCGGGTGTAAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAA															
C10xxx11	ATGACAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGACATGCCCGGTGATGAAGAAAGGCTTCGGGTGTAAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAA															
C13xxx12	ATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGACATGCCCGGTGATGAAGAAAGGCTTCGGGTGTAAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAA															
Prim. cons.	GTGATCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTCGGATGTAAGAACTCTGTTATTAGGGGAAGAA															

	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
B2xxxx1	AGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AAGTCACGAAAGTTGGTAACCCGAAGCCGGTGGCC	TAAACCTTG-TGGGGGAGCCGTCGAAGGTGGACCCGGC	GATTGGGACTA											
B9xxxx2	AGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AAGTCACGAAAGTTGGTAACCCGAAGCCGGTGGCC	TAAACCTTG-TGGGGGAGCCGTCGAAGGTGGACCCGGC	GATTGGGACTA											
B1xxxx0	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
C12xxxx5	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
C8xxxx9	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
B6xxxx8	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
B14xxxx13	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
B5xxxx7	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
B3xxxx3	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
C4xxxx4	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
B11xxxx6	AGTAATCGTAGATCAGCA-TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
C7xxxx10	AGTAATCGTAGATCAGAA-TGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
C10xxxx11	AGTAATCGTAGATCAGAA-TGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
C13xxxx12	AGTAATCGTAGATCAGAA-TGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
	*****	**** *	*	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Prim. cons.	AGTAATCGTAGATCAGCAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTC	AACCCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT	AACCTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGACAAATG	GATTGGGGTGA											
		1510													
B2xxxx1	AGTCGTAACAAGGT														
B9xxxx2	AGTCGTAACAAGGT														
B1xxxx0	AGTCGTAACAAGGT														
C12xxxx5	AGTCGTAACAAGGT														
C8xxxx9	AGTCGTAACAAGGT														
B6xxxx8	AGTCGTAACAAGGT														
B14xxxx13	AGTCGTAACAAGGT														
B5xxxx7	AGTCGTAACAAGGT														
B3xxxx3	AGTCGTAACAAGGT														
C4xxxx4	AGTCGTAACAAGGT														
B11xxxx6	AGTCGTAACAAGGT														
C7xxxx10	AGTCGTAACAAGGT														
C10xxxx11	AGTCGTAACAAGGT														
C13xxxx12	AGTCGTAACAAGGT														

Prim. cons.	AGTCGTAACAAGGT														

Alignement multiple des séquences *rpoB* des 12 isolats.



	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	
B5xxx3	CCAATTC	AATTACT	GATCAA	ATTGAT	TATTTAA	CTGCTG	ATGAAGA	AGATAG	CTATGT	AGTGC	ACAAGC	CAATTC	CGTTAG
B14xxx10	CCAATTC	AATTACT	GATCAA	ATTGAT	TATTTAA	CTGCTG	ATGAAGA	AGATAG	CTATGT	AGTGC	ACAAGC	CAATTC	CGTTAG
B3xxxx1	CCAATTC	AATTACT	GATCAA	ATTGAT	TATTTAA	CTGCTG	ATGAAGA	AGATAG	CTATGT	AGTGC	ACAAGC	CAATTC	CGTTAG
B6xxxx4	CAAATTC	AATTACT	GATCAA	ATTGAT	TATTTAA	CTGCTG	ATGAAGA	AGATAG	CTATGT	AGTGC	ACAAGC	CAATTC	CGTTAG
C4xxxx2	CTAATCT	ATTACAG	ATCAA	TCGACT	TAACAG	CTGATG	AAGAAG	ATAGCT	ATGTAG	TGCCA	AGCGA	AACTC	CGTTAG
B11xxx8	CTAATCT	ATTACAG	ATCAA	TCGACT	TAACAG	CTGATG	AAGAAG	ATAGCT	ATGTAG	TGCCA	AGCGA	AACTC	CGTTAG
C8xxxx6	CAACAGC	ATTACTG	ATCAA	TCGACT	TAACAG	CTGATG	AAGAAG	ATAGCT	ATGTAG	TGCCA	AGCGA	AACTC	CGTTAG
C12xxx9	CACATTC	AATCAG	ACCAAT	TGACTA	CTTAAC	AGCTG	ACGAAGA	AGAGCT	ATGTAG	TGCCA	AGCGA	AACTC	CGTTAG
B1xxxx0	CGAATAG	TATCAG	ATCAA	TTGAT	TATTTAA	CTGCTG	ATGAAGA	AGATAG	CTATGT	AGTGC	ACAAGC	CAATTC	CGTTAG
C7xxxx5	---	GTGTTG	AATG	ACTG	CAAA	TTCA	CTCTG	CTGATC	GAAGA	AGCA	CTAC	TATC	CCCA
C10xxx7	---	GTGTTG	AATG	ACTG	CAAA	TTCA	CTCTG	CTGATC	GAAGA	AGCA	CTAC	TATC	CCCA
C13xxx11	---	GTGTTG	AATG	ACTG	CAAA	TTCA	CTCTG	CTGATC	GAAGA	AGCA	CTAC	TATC	CCCA
Prim. cons.	C2AATTC	ZATTACT	GATCAA	TTGA	Z2TAA	CTGCTG	ATGAAGA	AGATAG	CTATGT	AGTGC	ACAAGC	CAATTC	CG2TTAG
	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
B5xxx3	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
B14xxx10	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
B3xxxx1	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
B6xxxx4	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
C4xxxx2	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
B11xxx8	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
C8xxxx6	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
C12xxx9	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
B1xxxx0	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
C7xxxx5	GCCGTAG	CAAA	GGCA	ATCAG	CTTGT	CAGCC	GCAC	CAAG	TTG	TCTG	CTG	CGA	CGAT
C10xxx7	GCCGTAG	CAAA	GGCA	ATCAG	CTTGT	CAGCC	GCAC	CAAG	TTG	TCTG	CTG	CGA	CGAT
C13xxx11	GCCGTAG	CAAA	GGCA	ATCAG	CTTGT	CAGCC	GCAC	CAAG	TTG	TCTG	CTG	CGA	CGAT
Prim. cons.	GTGTTT	CCGTGG	TAAACA	CACTGT	TATGG	CAAAA	GAAAA	ATGG	ACTAC	TGGAT	GTATC	CTAA	CAAG
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	
B5xxx3	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
B14xxx10	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
B3xxxx1	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
B6xxxx4	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
C4xxxx2	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
B11xxx8	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
C8xxxx6	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
C12xxx9	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
B1xxxx0	CTAAC	CGTGC	GTTA	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
C7xxxx5	CCAAC	CGTGC	ATTG	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
C10xxx7	CCAAC	CGTGC	ATTG	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT
C13xxx11	CTAAC	CGAG	CCTG	ATGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Prim. cons.	CTAAC	CGTGC	ATTG	ATGG	TGCG	AACATG	CAAC	GTCA	AGCAG	TACC	ATTG	ATG	AACT

	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	
B5xxx3	TTACTG	CAAAAC	ATAGAG	GTGTTG	AACACG	TTGAAT	CTAATG	AAATCT	TAGTCG	TCTTAG	TGAGG	AAAAAT	GGAAC
B14xxx10	TTACTG	CAAAAC	ATAGAG	GTGTTG	AACACG	TTGAAT	CTAATG	AAATCT	TAGTCG	TCTTAG	TGAGG	AAAAAT	GGAAC
B3xxx1	TTACTG	CAAAAC	ATAGAG	GTGTTG	AACACG	TTGAAT	CTAATG	AAATCT	TAGTCG	TCTTAG	TGAGG	AAAAAT	GGAAC
B6xxx4	TTACTG	CAAAAC	ATAGAG	GTGTTG	AACACG	TTGAAT	CTAATG	AAATCT	TAGTCG	TCTTAG	TGAGG	AAAAAT	GGAAC
C4xxx2	TTACTG	CTAAAC	ATAGAG	GTGTTG	AACATG	TTGAAT	CTAAAG	AAATCT	TAGTCG	TCTTAG	TGAGA	AGAAAC	GCGCAT
B11xxx8	TTACAG	CTAAAT	ATAGAG	GTGCGT	TGAACAT	GTGAAT	CTAAAG	AAATCT	TAGTCG	TCTTAG	TGAGA	AGAAAC	GCGCAT
C8xxx6	TTGTTG	CAAAAC	ATAAAG	CCGTG	TGAACAC	GTGAAT	CTAATG	AAATCT	TGTGTC	CAACTT	ATTGA	AGAAAT	GCCCA
B12xxx9	TTGTTG	CAAAAC	ATAAAG	CCGTG	TGAACAC	GTGAAT	CTAATG	AAATCT	TGTGTC	CAACTT	ATTGA	AGAAAT	GCCCA
C1xxx0	TTGTTG	CTAAAA	CAAGG	CCGTG	TGAACAC	GTGAAT	CTAATG	AAATCT	TGTGTC	CAACTT	ATCGA	AGAAAT	GCCCA
C7xxx5	CGGTAG	CTAAAC	GTGGT	GTGCGT	TGACAG	TGGATG	CTCCCG	TATCGT	TAT---	CAAAGT	TAACG	AAAGC	GAGAT
C10xxx7	CGGTAG	CTAAAC	GTGGT	GTGCGT	TGACAG	TGGATG	CTCCCG	TATCGT	TAT---	CAAAGT	TAACG	AAAGC	GAGAT
C13xxx11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Prim. cons.	TTACTG	CAAAAC	ATAGAG	GTGTTG	AACACG	TTGAAT	CTAATG	AAATCT	TAGTCG	TCTTAG	TGAGG	AAAAAT	GGAAC
		850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
B5xxx3	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
B14xxx10	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
B3xxx1	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
B6xxx4	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
C4xxx2	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
B11xxx8	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
C8xxx6	AGTTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
C12xxx9	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
B1xxx0	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
C7xxx5	AATACAC	CCGT	TAAACG	AACAC	CTGTAT	CAACCA	GAGT	GCCG	TGTGT	CTCTG	GGTGA	ACCG	TTGA
C10xxx7	AATACAC	CCGT	TAAACG	AACAC	CTGTAT	CAACCA	GAGT	GCCG	TGTGT	CTCTG	GGTGA	ACCG	TTGA
C13xxx11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Prim. cons.	AATTTA	AAACGT	TCAAAC	TCTGGT	ACTTGT	TATAAC	CAACG	TCCAAT	CGTTT	CTGTAG	GTGACG	TTGTAG	AATACA
B5xxx3	----												
B14xxx10	----												
B3xxx1	----												
B6xxx4	----												
C4xxx2	----												
B11xxx8	----												
C8xxx6	----												
C12xxx9	----												
B1xxx0	----												
C7xxx5	CGCT												
C10xxx7	----												
C13xxx11	----												
Prim. cons.	CGCT												

Annexe E

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET DES TAMPONS

Luria Bertani (LB):

Tryptone 10 g/L, Extrait de levure 5 g/L, Sodium Chloride 10 g/L.

Milieu ZYP :

Tryptone 10 g/L, Extrait de levure 5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 66 g/L, KH_2PO_4 136 g/L, Na_2HPO_4 142 g/L, Glycérol 250 g (m/v) Glucose 25 g, α -lactose 100 g.

Tampon de lyse :

50 mM HEPES pH 8, NaCl 150 mM, CoCl_2 0.2 mM, lysozyme 0,25 mg/mL, DNaseI 10 μ g/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 0,1 mM.

Tampon d'activité :

Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Éthane Sulfonique (HEPES) 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, CoCl_2 0,2 mM).

Annexe F

PREPARATIONS DES GELS ET DU TAMPON UTILISES DANS L'ETAPE DE
L'ELECTROPHORESE DE LA PROTEINE *SsoPox*

1/ Gel SDS-Page

La préparation des gels est réalisée de la manière suivante :

Tableau complémentaire 5: Préparation du Resolving Gel/ Gel de séparation (10 %)

	<i>2 gels</i>
<i>di H2O</i>	<i>6,3 mL</i>
<i>30 % Acrylamide</i>	<i>5,3 mL</i>
<i>1,5 M Tris pH 8,8,</i>	<i>4 mL</i>
<i>10 % SDS</i>	<i>160 µL</i>
<i>10 % APS</i>	<i>160 µL</i>
<i>TEMED</i>	<i>16 µL</i>
<i>Volume total</i>	<i>16 mL</i>

Tableau complémentaire 6 : Préparation du Stacking gel ou gel de concentration

	<i>2 gels</i>
<i>di H2O</i>	<i>6 mL</i>
<i>30 % Acrylamide</i>	<i>1,3 mL</i>
<i>1,5 M Tris pH 8,8,</i>	<i>2.5 mL</i>
<i>10 % SDS</i>	<i>100 µL</i>
<i>10 % APS</i>	<i>100 µL</i>
<i>TEMED</i>	<i>10 µL</i>
<i>Volume total</i>	<i>16 mL</i>

2/ Tampon d'extraction de Laemmli (concentré 5 fois)

A préparer et à utiliser avec des gants sous une hotte de chimie (le beta-mercaptoéthanol est dangereux et a une odeur nauséabonde)

Mélanger

5 mL de Tris /HCl 0,5 M pH 6,8 (mélanger 3 g de Tris Hydroxyméthyl aminométhane - 50 ml d'eau distillée - ajuster à pH 6,8 avec du HCl).

2 g de Sodium Dodécyl Sulfate.

4 g de Glycérol.

5 mL de beta-mercaptoéthanol.

1 mL de Bleu de bromophénol à 1%.

Compléter à 20 mL avec de l'eau distillée

Annexe G

CALCULE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PARAOXONASE DE SSOPOX

Pour passer de mDO/min à U/mL :

- La loi de Beer-Lambert permet de passer de l'absorbance à la concentration avec la relation $A = \epsilon l C$ (avec $\epsilon = 17000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et $l = 0.62178 \text{ cm}$). En divisant la valeur de la pente par ϵl , une valeur en M/min est obtenue.
- Multiplier par le volume réactionnel en litre (200 μL soit $2 \times 10^{-4} \text{ L}$) pour obtenir une valeur en mol/min.
- L'unité enzymatique U correspond à la quantité de substrat hydrolysé (ou de produit libéré) par unité de temps et s'exprime en $\mu\text{mol}/\text{min}$. Multiplier la valeur précédente par 10^6 pour obtenir cette unité.
- Le calcul est réalisé pour un volume d'enzyme de 2 μL . La valeur obtenue précédemment est multipliée par un facteur 500 pour obtenir un résultat final en U/mL.

ANNEXE H

RESULTATS DE L'EFFET DE SSOPOX SUR LES FACTEURS DE VIRULENCE

Tableau complémentaire 7: Résultats de l'effet de *SsoPox* sur l'activité protéolytique

Isolat	Sans <i>SsoPox</i> (Contrôle)		Traité avec <i>SsoPox</i> 0.5 mg/mL	
PA01	0,874	0,882	0	0
V 1	1	1,088	0	0
V 2	1,093	0,984	0,832	0,782
V 3	0,897	0,882	0	0
D1	1,142	1,012	0,025	0,017
D2	1,069	1,004	0	0
D3	1,079	1,039	0	0

Tableau complémentaire 8: Résultats de l'effet de *SsoPox* sur la production de la pyocyanine

Isolat	Sans <i>SsoPox</i> (Contrôle)		Traité avec <i>SsoPox</i> 0.5 mg/mL	
PA01	0,102	0,149	0	0
V 1	0,21	0,172	0,121	0,107
V 2	0,224	0,288	0,176	0,122
V 3	0,17	0,144	0,165	0,133
D1	0,278	0,258	0,077	0,087
D2	0,145	0,155	0	0
D3	0,03	0,043	0	0

Tableau complémentaire 9: Résultats de l'effet de *SsoPox* sur la production du biofilm

Isolat	Sans <i>SsoPox</i> (Contrôle)		Traité avec <i>SsoPox</i> 0.5 mg/mL	
PA01	47,9	44,9	3,7	1,3
V 1	2,94	12,32	16,2	5,3
V 2	5,04	3,04	1,49	1,25
V 3	7,18	4	1,32	3
D1	119,1	117,1	8,5	2,5
D2	13,2	15,1	2,1	4,2
D3	41,7	37,7	23,4	21,5

Résumés

RESUME

L'objectif visé par cette étude est, d'une part, d'évaluer la méthode MALDI-TOF MS pour l'identification bactériologique dans le cas des mammites subcliniques et d'autre part, de tester une nouvelle stratégie antivirulente contre une espèce bactérienne *P. aeruginosa* causant des infections respiratoires chez les bovins.

La première partie consiste à identifier 14 bactéries responsables des mammites subcliniques par MALDI-TOF MS confronté à l'ADNr 16S et le gène de ménage *rpoB*. Nos résultats ont montré une grande fiabilité de l'identification par MALDI-TOF MS au niveau de l'espèce couvrant 92,8 % des cas (13 isolats) avec un score supérieur à 2. Le MALDI-TOF MS et l'analyse bioinformatiques sont des outils qui peuvent substituer l'identification par simple séquençage des gènes ADNr 16S et *rpoB*.

La deuxième partie consiste à évaluer l'efficacité de l'enzyme *SsoPox*-W263I, pour empêcher la mise en place de la virulence chez trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des veaux pneumoniques, la souche modèle *P. aeruginosa* PAO1 et trois souches humaine. Pour cela, nous avons évalué *in vitro* la quantité de la pyocyanine, l'activité protéolytique et le biofilm. Nous avons observé, en présence de *SsoPox* W263I, une diminution de l'activité protéolytique et la production de pyocyanine dans 100 % des isolats. La synthèse du biofilm a diminué dans 86 % des isolats. L'enzyme *SsoPox* W263I par l'inhibition du *quorum* sensing atténue le pouvoir pathogène des *P. aeruginosa*. Elle peut donc constituer une alternative prometteuse aux traitements classiques.

Mots clés : Mammites subcliniques bovine, MALDI-TOF MS, *quorum* quenching, lactonase

ABSTRACT

The aim of this study is, firstly, to evaluate the method of MALDI-TOF MS for bacteriological identification in the case of subclinical mastitis in dairy cattle and secondly, to test a new antivirulent strategy against a bacterial species *P. aeruginosa* causing respiratory infections in calves.

The first part consists in identifying 14 bacteria responsible for subclinical mastitis by MALDI-TOF MS confronted with the 16S rDNA and the housekeeping gene *rpoB* sequencing technique. Our results showed high reliability of identification by MALDI-TOF MS at the species level covering 92.8% of cases (13 isolates) with a score greater than 2. MALDI-TOF MS and bioinformatic analysis are tools that can substitute the identification by simple sequencing using the 16S and *rpoB* rDNA genes.

The second part consists of evaluating the efficacy of the enzyme *SsoPox*-W263I, to prevent the establishment of virulence in three strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from pneumonic calves, the model strain *P. aeruginosa* PAO1 and three human strains. For this, we evaluated in vitro the amount of pyocyanin, the proteolytic activity and the biofilm. In the presence of *SsoPox* W263I, we observed a decrease in proteolytic activity and the production of pyocyanin in 100% of the isolates. Biofilm synthesis decreased in 86% of isolates. The enzyme *SsoPox* W263I by inhibition of quorum sensing attenuates the pathogenic power of *P. aeruginosa*. It can therefore be a promising alternative to conventional treatments.

Key words: Cattle Subclinical mastitis,, MALDI-TOF MS, *quorum* quenching, lactonase.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو أولاً، لتقييم طريقة MALDI- TOF MS لتحديد البكتيريا في حالة التهاب الضرع تحت السريري في الأبقار. وثانياً، لاختبار استراتيجية جديدة ضد البكتيريا *P. aeruginosa* المسببة لإلتهاب الجهاز التنفسي عند العجول.

الجزء الأول من هذا العمل هو تحديد أربعة عشر سلالة مسببة لالتهاب الضرع تحت السريري بواسطة تقنية MALDI-TOF MS واستعملنا كمراجع، التقنية الوراثة، عن طريق التحديد الجزيئي بواسطة ADNr 16S والجين *rpoB*. أظهرت النتائج موثوقية عالية لتحديد العزلات البكتيرية بواسطة MALDI-TOF MS حتى مستوى الأنواع، بنسبة تغطي 92.8 % من الحالات (13 عزلة) بنتيجة أكبر من 2. تحليل MALDI-TOF MS والمعلوماتية الحيوية هي الأدوات التي يمكن أن تحل محل التحديد البسيط باستعمال ADNr 16S والجين *rpoB*.

الجزء الثاني من هذا العمل يتمثل في تقييم فعالية انزيم *SsoPox-W263I*، لمنع الفوعة في ثلاث سلالات من *P. aeruginosa* معزولة من عجول مصابة بالالتهاب الرئوي و نموذج سلالة *P. aeruginosa* (PAO1) وثلاث سلالات سريرية بشرية. لهذا، قمنا في المختبر بتقييم كمية البيوسيانين، نشاط الانزيمات الحالة للبروتين و البيوفيلم. لاحظنا في وجود *SsoPox W263I* انخفاضاً في نشاط الانزيمات الحالة للبروتين وإنتاج البيوسيانين في 100% من العزلات و انخفاض تركيب البيوفيلم في 86% من العزلات. الانزيم *SsoPox W263I* عن طريق تثبيط إدراك النصاب (*Quorum Sensing*) يوهن القدرة الفوعية *P. aeruginosa* من خلال عدم قتلهم ولكن إبقاؤها في حالة غير خبيثة دون تشكيل البيوفيلم. و قد يكون هذا بديلاً واعداً للعلاجات المألوفة.

الكلمات المفتاحية: التهاب ضرع البقر تحت السريري، MALDI-TOF MS، إدراك النصاب، إنزيم الـ لاكتوناز

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

ARTICLES:

Guendouze, A., Djeghader, A., Oucheriah, Y., & Hamidechi, M. A. (2017). Identification of Bacteria Causing Subclinical Cow Mastitis : Comparative 16S DNA Sequence Analysis and Biotyping Using MALDI-TOF MS . *Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences*. **8**(1249), 1249–1254.

Guendouze, A., Plener, L., Bzdrenga, J., Jacquet, P., Rémy, B., Elias, M., Lavigne, J. P., Daudé, D., Chabrière, E. (2017). Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa and comparison with quorum sensing inhibitors. *Frontiers in Microbiology*. **8**(FEB), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00227>

PRESENTATIONS AFFICHEES

Guendouze A., Djeghader A., Ayeche., Labed L., Hamidechi M. A. Identification Of Bacteria Causing Subclinical Cow Mastitis Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS). *International Seminar of applied Biotechnologies on; Agriculture, Health and Environment. SIBAASE 17-19 April 2016*

Ayeche A., Guendouze A., Yagoubat M., Hamidechi M. A. Phenotypic and genotypic detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from infected patients. *International Seminar of applied Biotechnologies on; Agriculture, Health and Environment. SIBAASE 17-19 April 2016, Khenchela, Algeria.*

Nom : GUENDOUZE Prénom : Assia	Diplôme : Doctorat 3ème cycle LMD
Date de soutenance : 15 / 03 /2018	
Titre : Un apport des techniques moléculaires et bioinformatiques pour l'identification et la caractérisation fonctionnelle de germes causant les mammites subcliniques et les infections respiratoires chez les bovins à Constantine et à Batna.	
<p>Résumé</p> <p>L'objectif visé par cette étude est, d'une part, d'évaluer la méthode MALDI-TOF MS pour l'identification bactériologique dans le cas des mammites subcliniques et d'autre part, de tester une nouvelle stratégie antivirulente contre une espèce bactérienne <i>P. aeruginosa</i> causant des infections respiratoires chez les bovins.</p> <p>La première partie consiste à identifier 14 bactéries responsables des mammites subcliniques par MALDI-TOF MS confronté à l'ADNr 16S et le gène de ménage <i>rpoB</i>. Nos résultats ont montré une grande fiabilité de l'identification par MALDI-TOF MS au niveau de l'espèce couvrant 92,8 % des cas (13 isolats) avec un score supérieur à 2. Le MALDI-TOF MS et l'analyse bioinformatiques sont des outils qui peuvent substituer l'identification par simple séquençage des gènes ADNr 16S et <i>rpoB</i>.</p> <p>La deuxième partie consiste à évaluer l'efficacité de l'enzyme <i>SsoPox-W263I</i>, pour empêcher la mise en place de la virulence chez trois souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées des veaux pneumoniques, la souche modèle <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et trois souches humaine. Pour cela, nous avons évalué <i>in vitro</i> la quantité de la pyocyanine, l'activité protéolytique et le biofilm. Nous avons observé, en présence de <i>SsoPox W263I</i>, une diminution de l'activité protéolytique et la production de pyocyanine dans 100 % des isolats. La synthèse du biofilm a diminué dans 86 % des isolats. L'enzyme <i>SsoPox W263I</i> par l'inhibition du <i>quorum</i> sensing atténue le pouvoir pathogène des <i>P. aeruginosa</i>. Elle peut donc constituer une alternative prometteuse aux traitements classiques.</p> <p>Mots clés : Mammites subcliniques bovine, MALDI-TOF MS, <i>quorum</i> quenching, lactonase</p>	