

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR – ANNABA UNIVERSITY  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des sciences

Année : 2001 / 2002

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER

**IDENTIFICATION DU GENE DE LA PORINE OmpEa 35  
CHEZ *Enterobacter aerogenes***

Option  
Microbiologie appliquée

Par  
FETNACI LILIA

Directeur de mémoire : Boutefnouchet N. Maître de conférences Département de Biochimie

DEVANT LE JURY

PRESIDENT :	BOUZERNA N.	Professeur	Département de Biochimie
EXAMINATEURS	CETTIBI H.	Maître de conférences	Département de Biochimie
	ABDI A.	Chargée de cours	Département de Biochimie
	BENOUARETH D.	Maître de conférences	Département de Biochimie

## INTRODUCTION

L'environnement exerce continuellement sur les êtres vivants de nombreuses contraintes auxquelles ils doivent s'adapter pour survivre.

Une des réponses de cette pression de sélection est la mutation aléatoire du génome, capital pour l'adaptation comme au cours de l'évolution.

Le milieu hospitalier crée un environnement particulièrement hostile pour les bactéries. Ces dernières, disposent de plusieurs mécanismes de résistance aux agents antibactériens, dont certains sont gouvernés par une régulation génétique commune, ceci se traduit par un phénomène de multi-résistance, responsable d'échecs thérapeutiques, qui contribue à l'augmentation de la morbidité et des dépenses de soins. Il demeure à ce jour, un problème majeur de santé publique.

Actuellement, les  $\beta$ -lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés en thérapeutique. Les bactéries mettent en œuvre plusieurs systèmes affectant l'activité des  $\beta$ -lactamines : par inactivation enzymatique (pénicillinase,  $\beta$ -lactamases), par altération de la cible de l'antibiotique (modification des protéines de liaison à la pénicilline), par mise en place d'un système d'efflux (expulsion des antibiotiques), ou enfin par diminution de l'entrée de l'antibiotique par imperméabilité membranaire. Ce dernier mécanisme de résistance résulte, habituellement d'une diminution voire de disparition de l'expression des porines.

Dans les unités de soins intensifs, les entérobactéries sont responsables de plus du tiers des infections nosocomiales [13, 191]. Parmi elles, on trouve le genre *Enterobacter* dont les espèces impliquées sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme. Elles possèdent des caractéristiques physiologiques et génétiques bien adaptées à cette niche écologique particulière (pas d'exigences culturales particulières, facteurs de virulence transposables, dégradation de nombreux sucres) [183].

En 1990, il a été observé que l'espèce *E.cloacae* était quatre fois plus fréquente qu'*E.aerogenes*. A l'heure actuelle, ce rapport s'est inversé, plusieurs auteurs aux Etats-Unis ou en Belgique [28] notent que l'espèce *E.aerogenes* est désormais la plus représentée et la plus couramment isolée dans les services de soins intensifs [83, 183], et une étude française la rapporte dans 7% des isolats cliniques [10, 55].

*Enterobacter aerogenes* possède un système de défense complexe qui met en jeu plusieurs mécanismes de résistance modifiant l'accessibilité des molécules antibactériennes vers leurs sites d'action et permettant ainsi la résistance à plusieurs classes d'anti-infectieux: on parle de multirésistance aux antibiotiques ou MDR (Multi Drug Resistance). A partir de 1995, des souches cliniques d'*E.aerogenes* manifestant ce phénotype MDR aux  $\beta$ -lactamines sont apparues, ce phénotype est associée à une altération de l'expression des porines, engendrant une diminution importante de la concentration intracellulaire de l'antibiotique [125]. De plus, un phénomène d'efflux actif ainsi que l'activation d'enzymes hydrolytiques élargissant la résistance à d'autres classes d'anti-infectieux et participent au phénotype MDR [125].

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à une porine d'*Enterobacter aerogenes* analogue à OmpK 35 de *Klebsiella pneumoniae*, notre objectif est :

- d'identifier la séquence du gène de cette porine,
- de démontrer que la porine est fonctionnelle,
- d'étudier des séquences de gènes de la porine analogue à OmpK 35 chez des souches cliniques d'*Enterobacter aerogenes*, et mettre en évidence d'éventuelles mutations dans ces gènes,
- enfin de surproduire et de purifier la porine OmpEa 35.

Notre stage de recherche a été effectué au laboratoire de Biologie Moléculaire à l'INSERM, unité CJF 96-06 à la Faculté de Médecine de Marseille de Janvier 2001 à Février 2002, sous la direction du Pr. Claude Bollet, Dr en pharmacie et praticien hospitalier et le Dr Charléric Bornet, Dr en pharmacie, avec un contact régulier avec notre promoteur Dr N. Boutefnouchet, Maître de conférence en microbiologie, Faculté des Sciences à l'Université d'Annaba.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. CLASSIFICATION

*Enterobacter aerogenes* appartient au genre *Enterobacter* et à la famille des Enterobacteriaceae. Le genre *Enterobacter* fait partie du groupe KES (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*), qui est d'une importance considérable en clinique hospitalière. Considéré comme habituellement commensal non pathogène pour l'homme, de nos jours il est agent responsable d'infections nosocomiales et l'emploi intensif des antibiotiques a entraîné la sélection de souches multirésistantes [10, 16, 19, 120].

La classification du genre *Enterobacter* a été l'objet de nombreux remaniements [10]. Actuellement, le genre *Enterobacter* comprend 14 espèces (Bornet et al.) [19] *E.cloacae*, *E.aerogenes*, *E.gergoviae*, *E.pyrinus*, *E.asburiae*, *E.hormaechei*, *E.dissolvens*, *E.nimipressuralis*, *E.sakazakii*, *E.Taylorae*, *E.aminigenus* Biogroupe 1, *E.aminigenus* Biogroupe 2, *E.intermedium* et *E.kobei*. L'étude de ces différentes espèces a été déterminée par plusieurs auteurs [10, 11, 22, 24, 29, 39, 60].

Les espèces les plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier sont *E. cloacae* qui représente l'espèce type du genre *Enterobacter* et *E.aerogenes* [152].

**Remarque** : La classification de l'espèce *Enterobacter agglomerans* a fait l'objet de plusieurs discussions depuis 1989 [68] et a été actuellement reclassée comme *Pantoea agglomerans*.

L'espèce *Enterobacter aerogenes* se présente phénotypiquement et génotypiquement comme une *Klebsiella pneumoniae* mobile, ornithine décarboxylase-positif, uréase négative [19, 120]. Izard et al. [36] ont proposé de reclasser *E.aerogenes* dans le genre *Klebsiella* sous le nom de *Klebsiella mobilis*. Justifiée d'un point de vue taxonomique (hybridation ADN-ADN), cette proposition n'a pas été acceptée par les microbiologistes médicaux qui conservent le nom *E.aerogenes* [19, 120].

*E.aerogenes* est fréquemment isolée dans les prélèvements humains (respiratoires, urinaires, sanguins, gastro-intestinaux, cutanés) d'origine clinique. Ces souches sont de plus en plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales depuis 1992 en particulier en Europe Occidentale [6, 8, 43, 69, 74]. Jalaluddin et al. [84] ont observé une mortalité de 39 % chez les patients infectés.

## 2. HABITAT

*Enterobacter aerogenes* est une bactérie ubiquiste, retrouvée sur les plantes et dans le sol, l'eau et le tube digestif de l'homme et des animaux d'où le nom d'entérobactérie [22].

Elle constitue en effet, une part prépondérante de la flore intestinale de l'homme mais relativement peu rencontrée dans d'autres sites du corps; comme sur la peau et dans les muqueuses [10, 19, 22, 63, 77].

## 3. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

### 3. 1. Caractères morphologiques

*E.aerogenes* est un bacille à Gram négatif, de taille variable de 0,6 à 1 µm de large et de 1,2 à 3 µm de longueur, asporulé, capsulé (entouré d'une fine capsule), mobile, pourvu d'une cilliatrice péritriche ce qui le différencie de *Klebsiella pneumoniae* espèce taxonomiquement proche d'*E.aerogenes*) [18, 63, 77, 114].

### 3. 2. Caractères culturels

*Enterobacter aerogenes* se développe en aéro-anaérobiose sur des milieux ordinaires à base d'extrait de viande sans addition de NaCl ni d'autres suppléments. Peut croître dans un milieu minéral contenant comme seule source de carbone du métahydroxybenzoate [114].

Sur milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Hektoen, MacConkey, Luria Bertani...), les colonies d'*E.aerogenes* sont lactose (+) ou (-), bombées, légèrement muqueuses, d'un diamètre de 2 à 3 mm à bord régulier en 18 à 24 heures à 37 °C.

En milieu liquide, la culture est trouble et homogène au bout de 18 à 24 heures à 37°C [105, 150].

### 3. 3. Caractères biochimiques

*Enterobacter aerogenes* peut être définie comme une entérobactérie, catalase (+), oxydase (-), acétoïne (+), ornithine décarboxylase (+), réaction de Voges Proskauer (+),  $\beta$ -galactosidase (+), uréase (-), rouge de méthyle (-), indole (-), lysine décarboxylase (+), arginine dihydrolase (-), H<sub>2</sub>S (-), fermentant de nombreux substrats glucidiques (saccharose, mélibiose, raffinose, AMG :  $\alpha$ -méthyl - D-glucoside...) avec production de gaz, utilisant le citrate de Simmons et le malonate, gélatinase (-) [19, 22, 59, 93, 105, 114, 119, 120].

**Tableau 1** : Caractères biochimiques permettant la différenciation des deux espèces du genre *Enterobacter* les plus fréquemment rencontrées en clinique, d'après Farmer et al., 1985 [24].

Tests	<i>E.aerogenes</i>	<i>E.cloacae</i>
VP	+	+
Ornithine décarboxylase	+	+
Lysine décarboxylase	+	-
Uréase	-	
Arginine dihydrolase	-	+
Fermentation de :		
Glucose	+	(+)
Adonitol	+	(-)
D- Sorbitol	+	+
Raffinose	+	+
D- arabitol	+	-
Inositol	+	(-)

+ : réaction positive

- : réaction négative

(+) : réaction généralement positive    (-) : réaction généralement négative

### 3. 4. Caractères antigéniques

*Enterobacter aerogenes* possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries ou ceux d'autres bacilles à Gram négatif [89, 114].

- L'antigène somatique O : antigène de paroi composé d'un lipide A commun et toxique, d'une partie polyosidique commune à toutes les entérobactéries (le core) sauf de rares mutants et d'une partie polyosidique apportant la spécificité des formes smith (S). Les réactions d'agglutination se produisent lentement, sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation [89].

- L'antigène flagéllaire H : mobile, *Enterobacter aerogenes* possède un antigène flagéllaire polypeptidique et souvent diphasique (deux gènes différents codent pour deux types de flagellines mais leur contrôle génétique fait que l'expression du gène est pour un individu unique : dans la lecture, les deux types peuvent cohabiter).

Les réactions d'agglutination se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation [135].

- L'antigène capsulaire K : outre les antigènes O et H, *Enterobacter aerogenes* possède des antigènes capsulaires de nature polyosidique, apparentés à ceux de *Klebsiella pneumoniae* (K 4, 11, 26, 42, 59, 68 et 76) [89, 114].

#### **4. MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES D'*Enterobacter aerogenes***

Les stratégies d'investigation et de contrôle des infections nosocomiales sont relativement différentes lorsqu'on a affaire à la diffusion d'une souche épidémique à l'intérieur d'un service ou d'un établissement ou lorsqu'il s'agit d'une accumulation de cas due à des micro-organismes différents.

Il est donc primordial de pouvoir différencier ces deux situations. C'est là l'utilité des marqueurs épidémiologiques [107].

##### **4. 1. Marqueurs phénotypiques**

Les marqueurs épidémiologiques étaient traditionnellement représentés par l'étude de certains caractères phénotypiques des bactéries isolées. Ces techniques phénotypiques ont aujourd'hui une utilité limitée en épidémiologie bactérienne, ils comportaient l'étude de :

###### **4. 1. 1. La biotypie**

Ne permet généralement pas de différencier les souches cliniques. Elle consiste à étudier pour une souche donnée un crible de caractères biochimiques variables notamment le profil glucidique au sein de sa propre espèce dont le profil détermine un biotype (ou un biovare), cette méthode applicable aux seules espèces riches en caractères variables, nécessite

dans le choix des tests biochimiques discriminants des études préalables d'envergure. Cette méthode a été développée pour *Enterobacter cloacae*. *Enterobacter aerogenes* a le même schéma de biotypes que celui d'*E.cloacae* (fermentation du glucose, D-sorbitol, raffinose...) [18, 65, 106, 107].

#### 4. 1. 2. La sérotypie

Se définit comme une méthode de marquage des espèces bactériennes basée sur la détermination d'antigènes de surface (capsulaires, pariétaux ou flagellaires) à l'aide d'antisérums spécifiques [11, 18, 105, 107].

Les antigènes capsulaires d'*E.aerogenes* sont apparentés à ceux de *Klebsiella pneumoniae* (K4, 11, 26, 42, 59, 68 et 76) [114].

#### 4. 1. 3. La lysotypie

Permet au sein d'une même espèce bactérienne de distinguer (sous l'action d'une batterie prédéfinie de bacteriophages connus) l'(es) éventuel(s) phage(s) susceptible(s) de lyser la souche étudiée, Flynn et al. [61] ont utilisé cette technique pour le typage de 53 souches d'*E.aerogenes* et 157 souches d'*E.cloacae*. Ils ont obtenu 11 types différents pour *E.aerogenes* et 19 types pour *E.cloacae* [11, 18, 22, 105, 107].

**Remarque :** La sérotypie et la lysotypie, peuvent être réalisées à l'aide des réactifs utilisés pour *Klebsiella pneumoniae* [66].

#### 4. 1. 4. L'antibiotypie

C'est à dire le profil de résistance aux différents agents antimicrobiens. Les souches d'*E.aerogenes* possèdent une pénicillinase chromosomique de bas niveau responsable de la résistance à l'ampicilline, à la céfalotine et à la céfoxitine, une céphalosporinase qui est soit de bas niveau pour les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération soit de haut niveau pour les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération [19, 120].

Nauciel et al. [120] ont isolé une souche résistante aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération par dérégulation de la céphalosporinase chromosomique. Plus récemment, De Champs et al. [20, 120] ont rapporté dix cas d'infections nosocomiales dus à des souches d'*E.aerogenes* résistantes à l'imipénème, dans la majorité des cas, les patients avaient été traités auparavant à l'aide d'une antibiothérapie comprenant cet antibiotique.

La résistance aux antibiotiques peut également être causée par un défaut de pénétration dû à une altération de la perméabilité membranaire des souches d'*E.aerogenes*. En effet la perte de l'expression des porines entraîne une résistance aux molécules hydrophiles telle que les  $\beta$ -lactamines (dont les céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération) [19, 120].

#### 4. 1. 5. La bactériocytotypie

C'est une méthode qui est peu employée pour le marquage épidémiologique du genre *Enterobacter* [11, 18, 105].

### 4. 2. Marqueurs génotypiques

A l'heure actuelle, la plupart des épidémies reconnues à l'hôpital sont des épidémies de souches. C'est sur l'analyse du génome total qu'on s'appuie pour affirmer ou infirmer l'identité de deux souches bactériennes.

L'analyse du génome total a d'abord été réalisé en comparant les profils de restriction après digestion par des enzymes à sites de coupure fréquents. La limite de cette technique est que les bandes présentes sur les gels sont très nombreuses et qu'il est impossible de faire la part de différences fines, cette technique rapide peut souvent suffire si les différences entre les souches sont importantes mais le résultat ne peut être que qualitatif [107].

Les premiers travaux [48, 73, 140, 178] utilisant des méthodes génotypiques ont essentiellement concernés des épidémies à *E.cloacae*, les travaux concernant l'application de méthodes génotypiques à l'étude d'épidémie à *E.aerogenes* datent des années 1990.

Actuellement, l'électrophorèse en champ pulsé et le typage par amplification par PCR sont les techniques les plus utilisées dans l'enquête épidémiologique lors des épidémies à *E.aerogenes* et la transmission des bactéries multirésistantes (**tableau 2**) [22].

#### 4. 2. 1. L'électrophorèse en champ pulsé ou pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

L'électrophorèse classique en gel d'agarose (champ électrique constant) permet la séparation de fragments d'ADN dont la taille varie de quelques centaines de nucléotides à 50 kb. Au delà de cette taille, les fragments ne sont plus séparés et forment un front de migration. L'électrophorèse en champ pulsé a été développée par Carle et Olson en 1985 [166] pour l'étude des chromosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette technique consiste à fragmenter l'ADN total à l'aide d'enzymes de restriction à sites de coupures rares afin de diminuer le nombre de fragments.

Cette méthode est largement utilisée à l'heure actuelle en dépit de sa lourdeur [11, 18, 107], son principe est simple mais elle est longue à mettre en œuvre techniquement car les gros fragments d'ADN obtenus ne doivent pas être cassés lors des phases d'extraction. Il faut donc réaliser l'ensemble du processus en incluant les bactéries dans des petits morceaux d'agarose puis faire migrer les gros fragments dans des conditions particulières pour les différencier, c'est ce qu'on appelle l'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Le rôle de l'électrophorèse en champ pulsé dans la prise en charge d'une épidémie à *E.aerogenes* multirésistant aux antibiotiques a été déterminé par plusieurs auteurs (**tableau 2**) [6, 26, 29, 39, 51, 70, 84, 108].

Jalaluddin et al.[84] ont isolé 45 souches d'*E.aerogenes* de 33 patients dans plusieurs unités de l'hôpital universitaire Saint-Pierre en Belgique durant l'année 1995, où le pourcentage d'isolation d'*E.aerogenes* est très élevé par rapport à l'année précédente cette technique utilisant les enzymes de restriction Spe I et/ou Xba I révèle qu'il s'agit d'un clone prévalant (80%) qui est responsable des infections ou colonisations durant cette année.

Brovedani et al.[26] ont isolé *E.aerogenes* chez 15 patients entre janvier et août 2000 dans plusieurs services d'un hôpital français (médecine, chirurgie, gériatrie, pédiatrie, unités de soins intensifs), grâce à la technique en champs pulsé, deux génotypes sont différenciés, 15 profils de migration électrophorétique, sont identiques avec des pourcentages de similitudes allant de 81% à 100% .

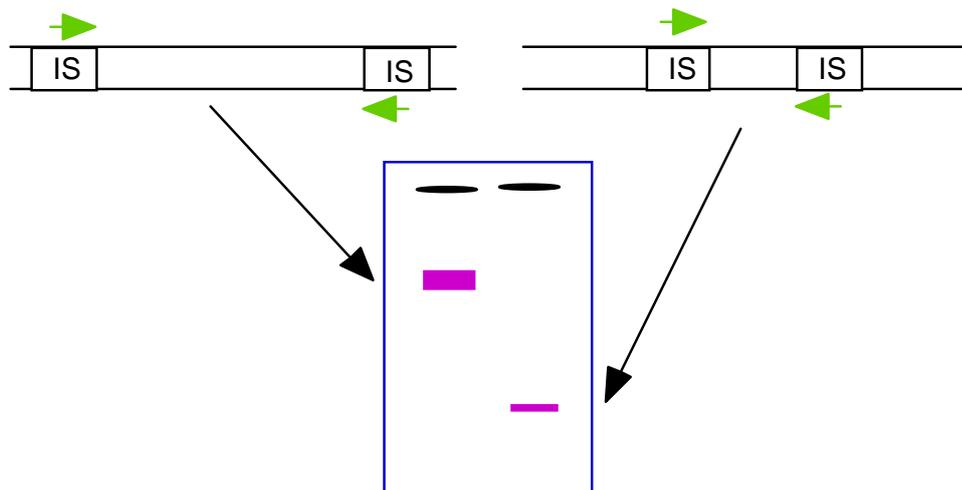
#### 4. 2. 2. Typage après amplification par PCR

La technique d'amplification génomique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est connue pour son efficacité comme méthode diagnostique. Le typage après amplification par PCR est très largement répandu en bactériologie [22]. Deux modalités d'application de la PCR au typage bactérien sont possibles.

#### 4. 2. 2. 1. Amplification à partir de séquences connues

Deux séquences conservées et répétées du génome bactérien ont été décrites chez les entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif [11].

Les séquences REP (Repetitive Element Palindromic) et les séquences ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) aux fonctions inconnues peuvent être utilisées comme sites de liaisons aux amorces dans la réaction PCR (REP-PCR ou ERIC-PCR) pour produire des profils différents [11]. Par amplification de séquences comprises entre des éléments ERIC, on obtient des profils du même type que par amplification aléatoire, mais qui sont souvent plus simples à comparer et à interpréter (**Figure 1**). Chaque souche possède un nombre, et une localisation variable de séquences ERIC, ainsi les séquences comprises entre ces éléments ERIC sont de taille variable on obtient donc des profils différents s'il ne s'agit pas de la même souche, ou des profils identiques s'il s'agit de souches apparentées épidémiologiquement [11, 22].

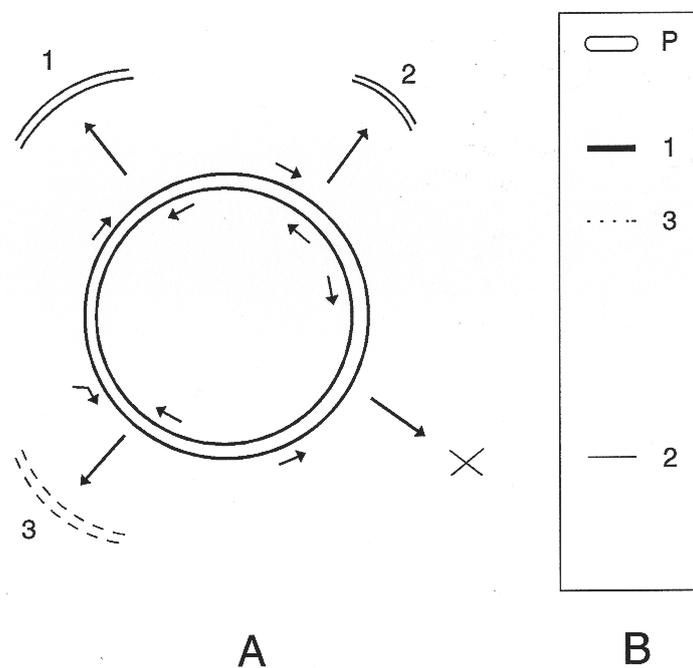


**Figure 1** : ERIC-PCR [22]

A gauche, production d'un fragment de grande taille, migrant peu et fixant beaucoup de colorant. A droite, production d'un fragment de taille plus réduite, migrant plus loin et fixant moins de colorant [22].

#### 4. 2. 2. 2. Amplification au hasard ou arbitrary primed PCR (AP-PCR ) ou Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD)

Elle consiste à amplifier par PCR des fragments du génome en utilisant comme amorces des séquences choisies au hasard. Les amorces choisies, d'une dizaine de bases et d'un G + C% 40, se répartissent sur le génome bactérien. Lorsque les deux amorces ont trouvé des homologies, le fragment d'ADN qui les sépare est amplifié par PCR, les produits d'amplification sont d'une intensité et de longueur variable [11, 51]. Après séparation électrophorétique sur gel d'agarose, on obtient des profils de bandes caractéristiques de l'ADN cible [176]. Les différentes étapes de la technique sont résumées dans la **Figure 2**.



**Figure 2** : Principe de l'amplification aléatoire [22]

Sur la figure de gauche, les amorces sont symbolisées par des flèches. A droite, représentation schématique du gel d'électrophorèse correspondant. On utilise une amorce unique d'environ 10 nucléotides. En 1, elle se fixe dans le sens direct et, à quelques centaines de bases, dans le sens complémentaire inversé, sur l'autre brin du chromosome bactérien. On obtient un signal fort sur le gel d'agarose. En 2, même situation, mais le fragment amplifié est de taille plus réduite. Il fixe moins le bromure d'éthidium et le signal est moins intense. En 3, l'amorce est hybridée complètement dans le sens direct, mais de façon incomplète en complémentaire inversé : il existe des mésappariements en 5'. L'amplification démarrera plus tard, le signal sera faible. En 4, les amorces sont trop éloignées, il n'y aura pas d'amplification [22].

A la différence de la PCR classique, l'utilisation d'amorces de séquences arbitraires présente l'avantage de ne nécessiter aucune information préalable concernant l'ADN étudié.

En bactériologie, on considère que deux profils sont différents quand ils diffèrent de deux bandes ou plus [45, 141, 183], on utilise successivement plusieurs amorces pour augmenter la quantité d'information en estompant les artefacts.

L'identité est habituellement proposée lorsque la taille des fragments d'ADN est la même, la taille étant déduite de la migration électrophorétique, l'identité repose alors sur une même distance de migration (**Figure 2**).

Si l'on veut améliorer l'interprétation afin qu'elle soit objective et reproductible ou si le nombre de profils à comparer est grand, il est indispensable de capturer électroniquement l'image des profils, détecter les pistes et les bandes et comparer les profils automatiquement à l'aide d'un logiciel de traitement d'image [84] répartissaient en deux clones distincts par restriction endonucléasique de l'ADN total (REA), génétiquement proches par rep-PCR .

Georghiou et al. [69] ont publié en 1995 un travail concernant le marquage épidémiologique de 62 souches de *E.aerogenes* isolées de patients hospitalisés en unités de soins intensifs par restriction endonucléasique de l'ADN total (REA), analyse de plasmides et PCR à l'aide d'amorces ERIC et REP. Les souches isolées chez des patients en hospitalisation de longue durée se répartissaient en deux clones distincts par REA, génétiquement proches par rep-PCR. Les souches isolées de patients hospitalisés récemment appartenaient à des types différents.

La technique de RAPD a été appliquée à l'étude d'une épidémie à *E.cloacae* et a été appliquée depuis en routine hospitalière par Davin-Regli et al. [42, 43, 44] à *E.aerogenes* (**tableau 2**).

**Tableau 2** : Travaux les plus récents (1995 -2000) portant sur l'étude épidémiologique d'*Enterobacter aerogenes* [22].

Auteurs	Année	Pays	Nombre de souches étudiées	Techniques utilisées	Services concernés	Résistance observée	Epidémie ?
Carlier	2000	Belgique	34	Champ pulsé	Réanimation		Oui
Bosi	1999	France	123	ERIC-PCR RAPD	Réanimations Médecine	BLSE Céphalosporinase	Oui
Jalaluddin	1998	Belgique	45	Plasmides Champ pulsé	Réanimation Médecine	BLSE Céphalosporinase	Oui
Pitout	1998	USA	31	Plasmides	Réanimation Médecine	BLSE Céphalosporinase	
De Gheldre	1998	Belgique	260	AP-PCR	Réanimations Médecine	BLSE Céphalosporinase	Oui
De Gheldre	1997	Belgique	34	ERIC-PCR AP-PCR Champ pulsé	Réanimations	BLSE Céphalosporinase Imipénème	Oui
Ploy	1997	France	57	RAPD	Réanimation Médecine	Cephalosporinase	Oui
Meunier	1997	France	42	Champ pulsé	Réanimation	BLSE Céphalosporinase	Oui
D'Agata	1997	USA	11	Champ pulsé	Réanimation	BLSE	
Allerberger	1996	Autriche	19	RAPD REP-PCR Champ pulsé	Réanimations	BLSE Céphalosporinase	Oui
Davin	1996	France	185	ERIC-PCR RAPD	Réanimations	BLSE Céphalosporinase	Oui
Arpin	1996	France	77	Plasmide Ribotype RAPD	Réanimation Médecine	BLSE Céphalosporinase Imipénème	Oui
Charrel	1996	France	80	Antibiotype Porines	Réanimation Médecine	absence de porine BLSE Céphalosporinase	
Davin	1996	France	41	RAPD	Réanimation	BLSE	Cas groupés
Neuwirth	1996	France	10	Champ pulsé	Réanimation Médecine	BLSE Céphalosporinase	Oui
Georghiou	1995	USA	62	REA ERIC-PCR	Réanimation Médecine	BLSE	Oui
Grattard	1995	France	20	Ribotype AP-PCR	Réanimation Médecine	BLSE	Cas groupés

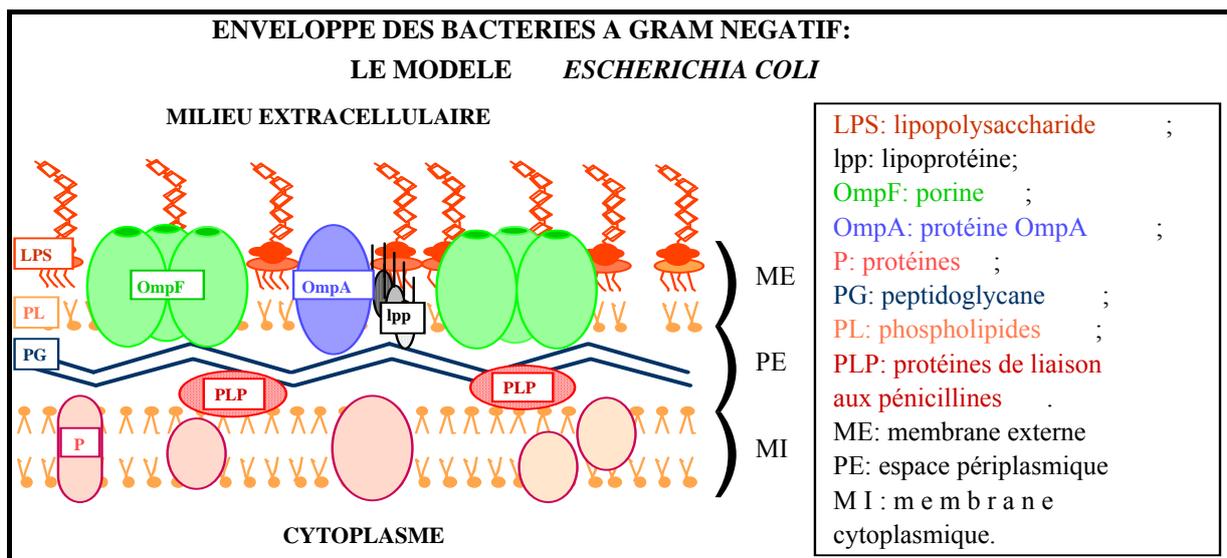
## 5. STRUCTURE MEMBRANAIRE D'*Enterobacter aerogenes*

*Enterobacter aerogenes* possède une enveloppe bactérienne dont la structure et la composition sont identiques à celles des autres bactéries à Gram négatif. Le modèle est celui d'*Escherichia coli*.

Cette enveloppe bactérienne est constituée d'une membrane cytoplasmique, d'un périplasma et d'une membrane externe (**Figure 3**).

La membrane cytoplasmique est le siège des systèmes de phosphorylation et de respiration et contient des perméases responsables de transports sélectifs, le périplasma contient des enzymes et des protéines affines pour différents substrats.

Sur la face interne de la membrane externe est localisé le peptidoglycane, ancré par des liaisons avec la lipoprotéine, les porines et la OmpA.



**Figure 3** : Enveloppe des bactéries à Gram négatif [132].

### 5. 1. Peptidoglycane (ou Muréine)

Il s'agit d'une macromolécule réticulée composée de longues chaînes glycaniques qui sont des copolymères alternés de N- acétyl glucosamine et d'acide N- acétyl-muramique. Des tétrapeptides sont branchés sur ces chaînes et une structure en réseau est constituée grâce à l'existence de ponts peptides entre les tétrapeptides.

La synthèse du peptidoglycane peut se décomposer en trois phases : les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme, ils traversent ensuite la membrane cytoplasmique puis ils ont polymérisé à l'extérieur. Au cours de la dernière étape, il y a d'abord formation de liaisons osidiques entre les disaccharides ou réaction de transglycosylation; ensuite des réactions de transpeptidation réalisent des ponts interpeptidiques, assurant ainsi la réticulation du peptidoglycane, les différentes réactions sont réalisées par des enzymes de transglycosylation et de transpeptidation appelées PLP (Protéines Liants les Pénicillines) [125, 167].

Ce sont en effet les cibles des  $\beta$ -lactamines, elles sont universellement présentes chez les bactéries et se situent à la face externe de la membrane cytoplasmique, leur nombre et leur spécificité variant en fonction des genres et espèces. Chez *E.coli*, espèce la plus étudiée, elles sont au nombre de sept : 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, et 6. Les PLP de haut poids moléculaire sont habituellement des enzymes bifonctionnelles (transglycosylases et transpeptidase). La fonction enzymatique précise de chacune des PLP a été étudiée en détail chez *E.coli*. Chaque PLP de haut poids moléculaire (PLP 1a, 1b, 2 et 3) semble avoir une fonction spécifique : les PLP 1a et 1b interviendraient dans l'élongation de la cellule, la PLP 2 serait impliquée dans le maintien de la morphologie globale de la bactérie, alors que la PLP 3 participerait à la formation du septum au cours de la division cellulaire [125, 167].

Les PLP de bas poids moléculaire (PLP 4, 5 et 6) ne semblent pas catalyser de réaction de transpeptidation et ne sont pas impliquées de façon prépondérante dans l'effet antibactérien des  $\beta$ -lactamines. Ces enzymes ont un rôle dans le remaniement du peptidoglycane, notamment au cours de la division cellulaire [112].

## 5. 2. Membrane externe

La membrane externe constitue un modèle d'adaptation à l'environnement, protégeant la bactérie des agressions extérieures physiques, chimiques ou biologiques. Elle est à l'interface entre le milieu extérieur et la bactérie. Elle joue le rôle de barrière vis-à-vis des sels biliaries, des enzymes du tube digestif ainsi que des métaux lourds et des détergents. Elle organise également le passage des substrats nécessaires à la survie et à la croissance de la bactérie. Elle est aussi le support de structures comme les fimbriaes, les adhésines et la capsule, qui interviennent dans la pathogénicité de la bactérie.

La composition lipidique de ce double feuillet est asymétrique (**Figure 3**) : les phospholipides, analogues à ceux de la membrane cytoplasmique, occupent la face interne, tandis que le lipopolysaccharide (LPS) constitue l'essentiel de la face externe. Les chaînes polysaccharidiques composant la partie externe hydrophile du LPS établissent entre elles des liaisons électrostatiques grâce à des cations métalliques divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) qui ordonnent la couche externe de la bactérie et la rendent peu perméable [102].

La composition protéique de la membrane externe peut se résumer en deux catégories:

- Des protéines de rôle structural, comme la lipoprotéine de Braun et la protéine OmpA, qui interagissent avec le peptidoglycane, principal composant du périplasma qui donne à la bactérie sa forme et maintient son intégrité face aux variations environnementales. Elles participent ainsi à la cohésion structurale de l'enveloppe bactérienne.
- Des protéines de transport comme les protéines spécifiques énergie-dépendantes, les transporteurs spécifiques, les transporteurs non spécifiques.

Les protéines spécifiques, énergie-dépendantes ont une fonction qui nécessite l'apport d'énergie *via* la protéine TonB, transductrice d'énergie [96]. On peut citer parmi ces transporteurs : BtuB pour la vitamine B12, FepA ou FhuA, par exemple, pour les sidérophores.

Les transporteurs spécifiques (transport préférentiel) ont un site de fixation pour certains ligands, modulant la diffusion de ceux-ci. On connaît sur ce modèle : Tsx pour les nucléosides, SrcY pour le saccharose ou encore LamB (récepteur du phage lambda) pour le maltose et les maltodextrines, qui est la mieux connue [158].

Les transporteurs non spécifiques, communément appelés « porines » assurent la diffusion passive. *E.coli* K12 exprime dans les conditions biologiques courantes en particulier celles du tube digestif de l'homme deux porines OmpF et OmpC [102, 133] dont la quantité relative dépend des conditions de croissance: osmolarité, température et sources de carbone. Dans des conditions limitantes en phosphate, la bactérie exprime également une porine ayant une affinité pour celui-ci: la phosphoporine, PhoE.

### 5. 3. Les porines

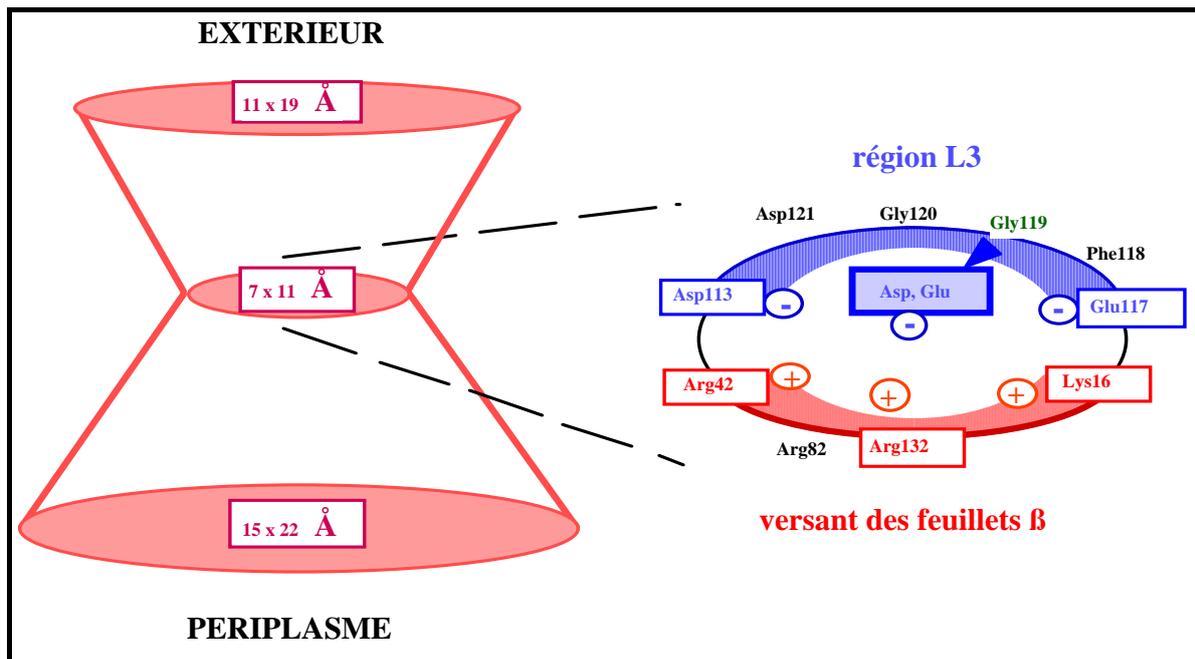
Ce sont des protéines assemblées en trimères; chaque monomère organise un pore hydrophile dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, qui permet aux solutés d'un poids moléculaire de 600 daltons environ de diffuser. Les porines sont présentes au nombre de  $10^5$  copies par cellule, ont un poids moléculaire de 35 à 40 kda, et sont fortement associées au peptidoglycane et au LPS (**Figure 3**). Cette quantité élevée se traduit par une concentration importante de canaux dans la membrane externe et explique la nécessité d'une régulation efficace de leur expression [132].

#### 5. 3. 1. Structure des porines

A partir des années 90, la résolution des structures de porines a permis de localiser un certain nombre de régions importantes pour l'insertion dans la membrane, la structure et la fonction et ainsi de comprendre l'effet des mutants d'*E.coli* isolés au cours des années précédentes. A côté de ces approches de cristallisation éclairant la structure, l'utilisation de techniques de gonflement de liposomes a permis d'évaluer la diffusion des sucres à travers les porines, plus récemment, c'est le développement des mesures, d'électrochimie en bicouche lipidique, définissant les caractéristiques électriques du pore, qui ont apporté les paramètres indispensables de mesure de l'activité [52, 154].

- **Structure primaire et secondaire :**

Les séquences des porines OmpF, OmpC et PhoE d'*E.coli* montrent une homologie stricte de plus de 50% dans leur séquence en acides aminés: on peut noter 77% de conservation entre les gènes d'ompF et phoE et 63% entre leurs produits. Tout comme la structure de la porine de *Rhodobacter capsulatus* (résolue à 1,8 Å par cristallographie aux rayons X), première structure résolue du genre, la structure d'un monomère d'OmpF s'organise en 16 feuillets  $\beta$  antiparallèles, reliés par des boucles de taille variable (**Figure 4**) [38, 91, 155, 180].

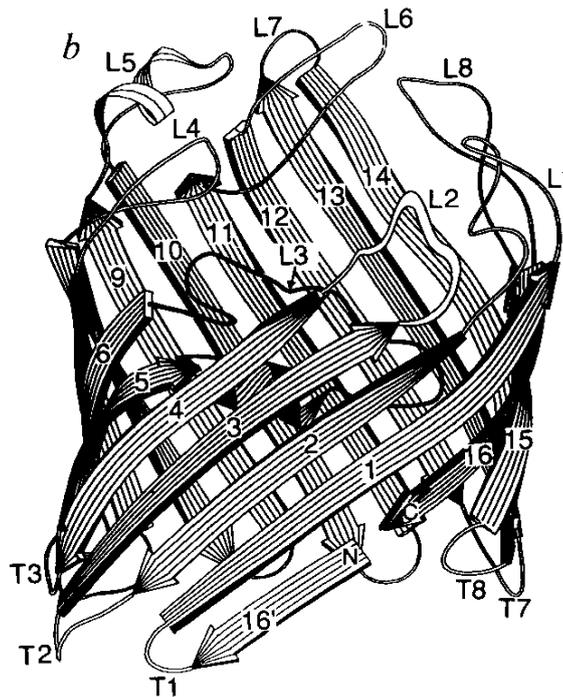


**Figure 4** : Représentation schématique du pore et du champ électrostatique existant au niveau du goulet d'étranglement d'OmpF. Groupements ionisables de L3 dans la région de constriction du pore [132].

- Repliement et stabilisation

Le monomère se replie en formant un tonneau, enfouie dans la membrane, qui ménage un canal hydrophile en son milieu et une paroi hydrophobe vers la membrane, les parois du tonneau sont constituées de feuillettes  $\beta$  transmembranaires. Des boucles courtes vers le périplasme et huit boucles longues à la surface externe de la cellule, relient les différents feuillettes antiparallèles et complètent la conformation du monomère. La boucle L2 d'un monomère établit des interactions avec les boucles L2 et L4 des sous-unités voisines et contribue ainsi à la stabilisation du trimère, de plus un pont salin connecte le N-terminal et le C-terminal d'un même monomère; il apparaît que le résidu phénylalanine en C-terminal a un rôle important dans le repliement, la trimérisation et l'insertion dans la membrane.

Enfin, la surface d'un monomère consacrée aux interactions hydrophobes avec d'autres sous-unités est estimée à 35%. La boucle L3 joue un rôle majeur : elle est inclinée dans le canal et provoque une constriction en son milieu (**Figure 5**) [132].



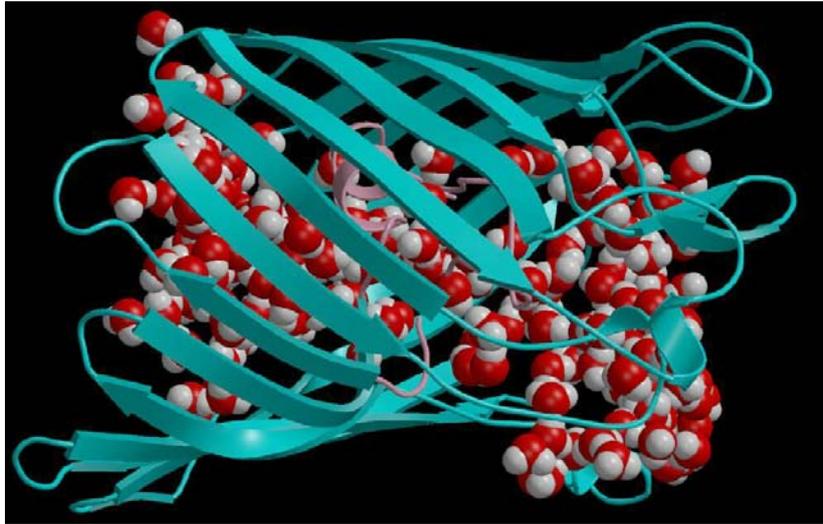
**Figure 5** : Modèle de la structure de la porine d'*E.coli*.

Les 16 feuillets  $\beta$  sont représentés par des flèches numérotées de 1 à 16. Les extrémités C et N terminales se touchent. Les coudes situés du côté périplasmique sont très serrés, contrairement aux boucles localisées à la surface cellulaire. La boucle L3 située entre les feuillets  $\beta 5$  et  $\beta 6$  plonge dans le pore [132].

- La zone de constriction

C'est la zone d'étranglement au milieu du tonneau, elle est à la base des propriétés physico-chimiques de la porine comme la conductance ou la sélectivité, délimitée par la boucle L3, offre un diamètre de 0,7 x 1,1 nanomètres aux solutés hydrophiles (**Figure 6**).

L'intérieur du tonneau est constitué des chaînes latérales des acides aminés chargés contenus dans les feuillets  $\beta$ ; cela organise ainsi des cercles de groupements positifs ou négatifs qui vont se réduire jusqu'à la zone de constriction [38, 91]. A ce niveau, on observe une partition des charges : un arc de charges négatives, provenant des groupements  $\text{COO}^-$  des chaînes latérales des résidus acides de L3 (Asp, Glu) fait face à un arc de charges positives portées par les groupements  $\text{NH}_3^+$  des chaînes latérales des résidus basiques (Lys, Arg, His) de feuillets  $\beta$ , rejetées vers l'intérieur, ce-ci suggère l'existence de nombreuses interactions ioniques et donc un rôle stabilisateur de L3.



**Figure 6** : La porine *d'E.coli* avec son eau d'hydratation [22].

Cette concentration de charge sur une petite distance, instaure un champ électrostatique qui va interagir avec les charges présentes sur le soluté et son orientation sera la résultante des interactions, ainsi la diffusion d'une molécule dépendra de son potentiel de surface [132].

Actuellement, en utilisant la technique de bicouches lipidiques planes, on peut ainsi définir un certain nombre de paramètres physiques/ électriques qui caractérisent le canal créé par une porine donnée, dépendance au voltage, conductance, sélectivité. Ces données sont en quelque sorte la carte d'identité de la porine et différent d'une protéine à l'autre puisqu'elles sont reliées au diamètre du canal et à l'organisation des charges qui le constituent. La définition de ces propriétés intrinsèques a enfin d'expliquer le choix, la sélection d'une porine par rapport à l'autre en réponse aux conditions de l'environnement (osmolarité, température, acidité ...) [132].

La séquence PEFGG (résidu 116 à 120 pour OmpF) qui forme un coude à l'extrémité de la boucle L3, est fortement conservée chez les entérobactéries. La proline amorce la formation du coude, l'acide glutamique et la phénylalanine interagissent avec les parois du pore, les deux glycines doivent être conservées du fait de leurs capacités de torsion particulière, une courte hélice $\alpha$ , qui fait suite à cette séquence participerait au repliement de L3 et de la protéine assurant sa stabilité fonctionnelle [22, 168].

### 5. 3. 2. Fonctions des porines

La fonction des porines est d'assurer la diffusion, à travers la membrane externe, des petits solutés hydrophiles indispensables à la vie et à la croissance de la bactérie [14]. La vitesse de diffusion d'un soluté dépend de sa taille, de son hydrophilie et de sa charge : elle sera d'autant plus élevée qu'il est petit et hydrophile. L'effet de sa charge dépend du type de porine impliquée : OmpF et OmpC ont en effet une sélectivité cationique, et PhoE une spécificité anionique [22].

Cette sélectivité est liée aux charges présentes dans la zone de constriction, au potentiel électrostatique engendré dans cette zone et au niveau de l'embouchure du canal.

Afin de mieux comprendre la sélectivité de ces transporteurs, OmpF et PhoE sont aujourd'hui utilisées comme modèles et comparées. Il apparaît qu'OmpF montre des potentiels électriques de 10 mV/nm à l'entrée du canal et 200 mV/nm dans la zone de constriction. Les deux types de porines présentent une dépendance au voltage au-delà d'un certain potentiel seuil, le canal se ferme, de plus ce phénomène est asymétrique, dépendant du sens d'application du courant.

Les porines assurent aussi d'autres fonctions : elles servent en effet de récepteurs aux bactériophages (TC 45 pour PhoE, Tul a pour OmpF, Tul b pour OmpC) et aux colicines. Les porines jouent aussi un rôle clé dans la pénétration des  $\beta$ -lactamines; ces petites molécules (300-600 daltons), chargées et hydrophiles utilisent la porine comme voie de pénétration [76, 128].

### 5. 3. 3. Régulation de l'expression des porines

Les entérobactéries peuvent se développer dans des conditions environnementales très différentes en pH, osmolarité, température, nutriments... Pour la bactérie, ces variations se traduisent par une contrainte ou une sélection sur les composants de l'enveloppe qui vont assurer sa survie et sa croissance. Un des processus physiologiques les plus importants qualitativement et quantitativement associé à l'enveloppe est le contrôle de l'imperméabilité et plus précisément la mise en place des systèmes de diffusion passive assurant l'entrée des nutriments, c'est les porines non spécifiques [52, 127, 129, 155].

La présence simultanée des deux porines OmpF et OmpC dans la membrane de *E.coli* a posé le problème de leur régulation et leur rôle. OmpF est décrite comme la porine la plus efficace avec un diamètre plus important [129] assurant donc l'approvisionnement de la bactérie en condition de carence à l'opposé la diffusion est plus restrictive *via* OmpC qui possède un diamètre plus restreint.

Après analyse des propriétés physico-chimiques du canal membranaire et la résolution de la structure tridimensionnelle (3D) [155], la conservation de ces molécules peut s'expliquer par une stratégie bactérienne de régulation afin de contrôler rigoureusement et précisément la diffusion des éléments indispensables, sucres, sels... ou dangereux, acides, détergents... pour la cellule à travers la barrière membranaire dans le cas des porines [132].

Différentes étapes interviennent pour assurer la réponse à ces stimuli, et réguler l'expression des porines adaptées à ces conditions du milieu. Au cours de ces processus interviennent :

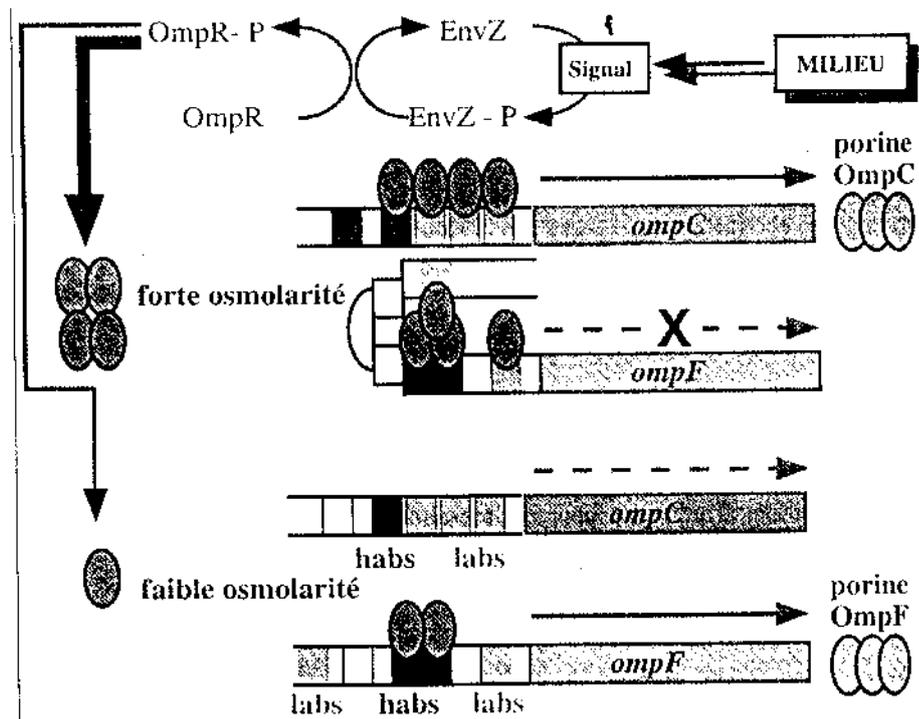
- des senseurs qui sont sensibles au milieu extérieur
- des effecteurs qui sont modifiés directement par le signal reçu des senseurs, ou modifiés indirectement *via* l'action de transmetteurs/ transducteurs et qui modulent l'expression des gènes et qui sont :

➤ **EnvZ- OmpR :**

Pour les porines non spécifiques, la régulation la plus étudiée concerne le système d'osmorégulation : un système à deux composants, EnvZ- OmpR, qui intervient au niveau de la transcription et gouverne l'expression des porines [118, 142].

EnvZ est une protéine agissant comme un senseur membranaire qui détecte les variations de l'osmolarité externe (peut être *via* le MDO, un oligo-saccharide périplasmique qui pourrait jouer un rôle de piège à ions et de tampons). Cette protéine sous l'action du signal, transmet l'information, par phosphorylation du régulateur, OmpR.

OmpR phosphorylé présente une affinité élevée pour des sites à haute et basse affinité, situés dans la région promotrice des gènes *ompC* et *ompF*. A faible osmolarité, peu de OmpR est phosphorylé : il se fixe préférentiellement sur les sites de forte affinité activant la transcription de *ompF*. Une phosphorylation importante de OmpR se produit à forte osmolarité, ces molécules se lient aux deux types de sites et bloquent ainsi la transcription de *ompF* favorisant celle de *ompC* (**Figure7**).



**Figure 7** : Régulation *via* EnvZ-OmpR [132]

➤ **IHF :**

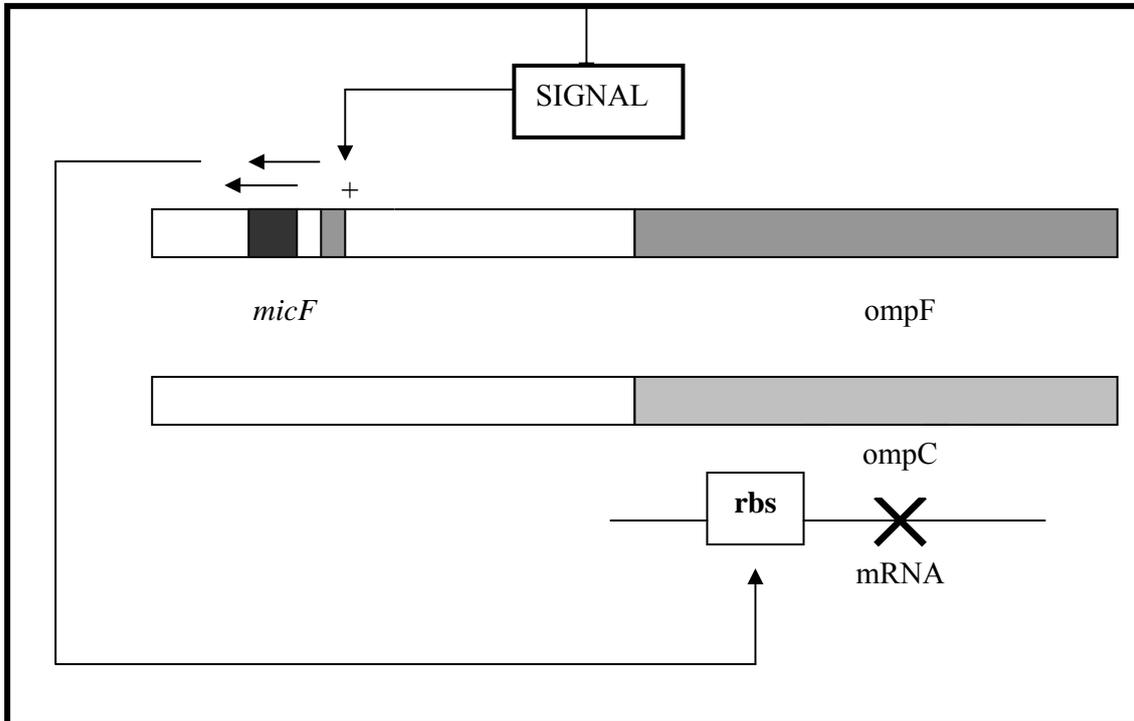
IHF est une protéine similaire aux histones : affine pour certains sites de l'ADN, elle joue un rôle clé dans la régulation de la réplication, la transcription et la recombinaison spécifique. Certains de ces sites présents *en aval* des gènes *ompC*, *ompF* et *envZ/ ompR*.

IHF facilite ainsi la répression de la transcription de *ompF* par OmpR-P alors qu'elle semble faiblement agir sur celle de *ompC* [142].

➤ ***micF* :**

*micF* ( mRNA Interfering Complementary RNA), est un petit ARN anti-sens [118, 142] localisé *en amont* du gène *ompC* et transcrit dans la direction opposée et présente un autre aspect de la régulation des porines ; par la température. L'existence de deux promoteurs en tandem génère deux espèces d'ARN (4,5 S et 6 S) contenant des séquences complémentaires de la Shine-Dalgarno et des régions d'initiation de la traduction de l'ARN messager *ompF*.

L'ARN 4,5 S crée un duplex stable avec le site de fixation du chromosome de *ompF* inhibant la traduction et sans doute déstabilisant le messager. La transcription de *micF* est stimulée d'un facteur 10 à 37°C et au delà (**Figure 8**) [132].



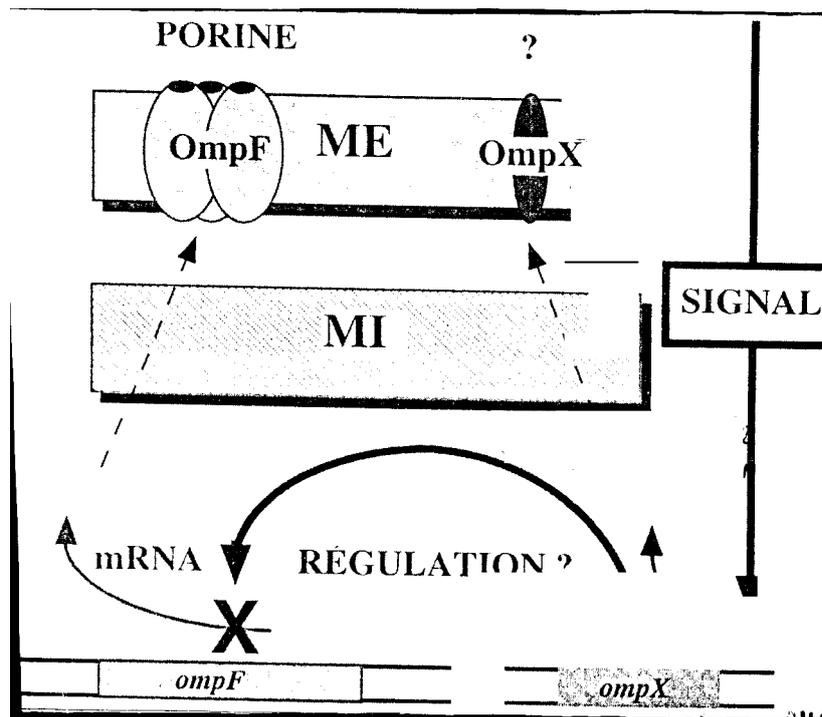
Signal: alcool, pH, ..., *micF*: site de l'ARN antisens, *ompC*, *ompF*: gènes de porines, rbs : site de fixation du ribosome, X : symbolise inhibition

**Figure 8** : *MicF* [132]

Il existe d'autres systèmes tel que : le stress oxydatif (Sox) et la résistance (Mar) qui jouent un rôle dans la réponse aux agents toxiques tel que l'éthanol, les acides faibles....) et qui activent l'expression de *micF* par l'intermédiaire de DBP (DNA Binding Proteins) [113].

➤ **OmpX :**

OmpX est une petite protéine de la membrane externe ( $\approx 170$  acides aminés) identifiée chez *E.cloacae*, *E.coli* et *K.pneumoniae*... La surproduction de cette protéine entraîne la chute de la quantité de porines présentes dans la membrane externe. OmpX agit au niveau de la transcription bloquant la synthèse de l'ARNm de OmpF (**Figure 9**) [132, 164, 165].



OmpF : porine, OmpX : protéine OmpX, ? : fonction inconnu, *ompX*, *ompF* : gène de protéine de la membrane externe, ME : membrane externe, MI : membrane interne, X : symbolise inhibition.

**Figure 9** : OmpX [132]

Il faut noter que la phase de croissance bactérienne module l'expression des porines. Par ailleurs, la synthèse des porines est aussi associée à la synthèse du LPS, certains mutants altérés dans le LPS montrant des niveaux variables de ces protéines [129].

Toutes ces voies de régulation assurent une efficacité de l'expression. Certaines conditions de carence peuvent activer l'expression de porines spécialisées : en concentration très faible en phosphate la phosphoporine PhoE est exprimée aux dépend des autres, en présence de maltodextrines, c'est la maltoporine LamB qui est alors synthétisée [127, 129].

### 5. 3. 4. Résistance et perméabilité membranaire

#### ➤ **β-lactamines et porines :**

Les porines jouent un rôle clé dans la pénétration des antibiotiques. En effet les β-lactamines représentent le soluté idéal : petite molécule (<600 daltons), chargée (anionique, dianionique, zwitterionique...) et hydrophile pour diffuser dans le canal [76,128].

Actuellement, les études les plus récentes ont permis d'évaluer les régions du canal, la zone de constriction chez OmpF ou PhoE, qui participent au passage des β-lactamines chez *E.coli*. Dans ce contexte, il faut mentionner le cas particulier de la porine D2 de *P.aeruginosa* et son implication dans la pénétration des carbapénèmes [151], en ce qui concerne les quinolones les résultats sont moins évidents, même si les porines pourraient intervenir dans le cas des fluoroquinolones, cela semble moins exclusif que pour la classe des β-lactamines et l'absence de données cinétiques précises ne permet pas d'élucider clairement la voie d'entrée.

Les études entreprises sur diverses espèces bactériennes exprimant leur porines spécifiques ont mis en lumière la relation entre canal et pénétration des céphalosporines dans la cellule. Ainsi, les travaux entrepris sur la diffusion de céphalosporines ont établi clairement que le coefficient de perméabilité, donc de pénétration dans la bactérie, varie considérablement d'une espèce à l'autre. L'exemple le plus remarquable est celui de la céphaloridine qui voit son coefficient chuter dramatiquement lorsque l'on passe d'*Escherichia* à *Pseudomonas* puis *Mycobacterium* [87, 126, 170]. Dans ces conditions, les études sur la structure de la membrane et du canal sont nécessaires afin de comprendre l'aspect cinétique et donc d'approcher la sensibilité à l'antibiotique.

Tous ces travaux ont assuré le développement de techniques biochimiques et immunologiques qui ont à leur tour permis de caractériser, chez les souches cliniques, l'importance de la perméabilité membranaire dans la sensibilité aux antibiotiques [132].

Actuellement, le nombre de souches résistantes aux β-lactamines et dépourvues de porines est impressionnant. Au cours de ces dernières années plusieurs travaux ont montré la relation entre la disparition des porines et la résistance chez *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*...[28, 31, 106, 170]. En fait, il faut noter que si les cas de souches documentées comme porines déficientes sont nombreux une seule enquête sur la relation « résistance/porine » a été réalisée et elle ne s'adressait qu'à une

population restreinte lors de cette étude, une proportion élevée d'isolats d'*E.aerogenes* multi-résistants aux céphalosporines manifeste le phénotype porine-déficient [31].

Enfin, la résistance aux dernières molécules, céfépime ou céfpirome, semble intimement associée à ce phénotype, tout au moins chez *Enterobacter*. Cette absence est très souvent associée à la production d'enzymes, stratégies qui traduisent une résistance élevée aux céphalosporines. Le défaut de porine apparaît fructueux à un plus d'un titre pour la bactérie, par la barrière membranaire qui limite alors la concentration intracellulaire d'antibiotiques en dessous de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), mais aussi par cette faible quantité qui peut alors déréguler l'expression de la céphalosporinase inductible [132].

Ce problème d'expression interpelle les chercheurs sur le mécanisme responsable de la disparition des porines chez les isolats. Malgré le nombre d'isolats présentant le profil porine-éficent, peu d'informations sont disponibles concernant l'origine du phénotype. Dans certains cas il semble que la disparition des porines soit la conséquence de mutations dans le LPS qui pourraient altérer alors la voie d'assemblage des protéines dans la membrane externe [144].

Un phénomène plus général est ainsi observé touchant l'équilibre physiologique de l'enveloppe et pouvant se traduire par des changements de la morphologie bactérienne, ces modifications pouvant générer les phénotypes de type leaky (libération de matériel périplasmique dans le milieu), rugueux (altérations des LPS)... qui traduisent une «pathologie» de l'enveloppe bactérienne.

A côté de ces modifications importantes de la physiologie de l'enveloppe, il semble que la régulation de l'expression des porines *via* OmpX intervienne dans certains cas. Il a été observé chez des isolats d'*E.cloacae* résistants aux céphalosporines, que la perte des porines s'accompagnait de l'expression d'une protéine de taille voisine de OmpX ; dans certains isolats, la protéine exprimée présenterait une parenté immunologique avec OmpX [164, 165].

En fait, dans les travaux entrepris récemment, une comparaison est réalisée entre l'expression des porines et d'autres protéines standards de la membrane externe, cette démarche permet la discrimination entre un effet pléiotropique sur la structure pariétale, incluant de larges alternations de constituants de base, et un effet spécifique s'adressant à la régulation d'une classe particulière de protéines, les porines [132].

Dans le cas de la régulation par le couple EnvZ-OmpR, la réponse est plus délicate. De nombreux mutants ont été isolés à l'échelle du laboratoire indiquant la possibilité d'une telle éventualité *in vivo* sous la pression de l'environnement. Le problème est ardu, les travaux fondamentaux montrent une grande complexité des étapes de contrôle et l'existence, de branchements parallèles ou annexes dans cette cascade de régulation ou se côtoient des facteurs de réponse à la température, l'acidité, l'osmolarité ... Un des exemples de régulation complexe des porines fait intervenir *mic F* et la régulation coordonnée du mécanisme d'efflux [132].

## 6. EPIDEMIOLOGIE D'*Enterobacter aerogenes*

### ➤ Evolution dans le temps

L'épidémiologie d'*E.aerogenes* a été en constante évolution depuis les années 1980. Schématiquement, on peut distinguer trois périodes très différentes :

- Avant 1993, *E.aerogenes* était rarement rencontré dans les hôpitaux français. Dans les années 1980, les infections à *Enterobacter aerogenes* étaient exceptionnelles. Les infections décrites concernaient les patients ayant bénéficié d'une chirurgie, les brûlés et les nouveaux-nés [43, 111].

En 1984, aux Etats Unis, les infections nosocomiales (principalement pneumopathies et septicémies) dues au genre *Enterobacter* représentaient 6% dont 1,5% revenaient à *E.aerogenes* [55, 60, 64, 131]. A cette époque les cas d'infections croisées n'avaient été décrits que pour *E.cloacae* [25, 60].

Il était déjà admis que *E.aerogenes* faisait partie de la flore digestive normale, fréquemment source de contamination endogène [58, 61].

Le traitement par les  $\beta$ -lactamines était déjà décrit comme sélectionnant des souches résistantes capables de coloniser par la suite le tractus urinaire ou respiratoire des patients. Mais on ne parlait pas encore de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) et de céphalosporinase déréprimée, les souches ne présentaient alors qu'une pénicillinase chromosomique.

L'émergence des souches productrices de BLSE ne concernait alors que *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae* [136]. Au cours de l'année 1991, sont apparues des souches d'*E.aerogenes* exprimant une BLSE. Les services de chirurgie, de réanimation, de néonatalogie et ceux prenant en charge les grands brûlés étaient les plus impliqués dans l'apparition des micro-organismes producteurs de BLSE.

En fait, toutes les études épidémiologiques réalisées avant 1992 concernaient le genre *Enterobacter* dans sa globalité sachant que sur l'ensemble des souches étudiées seulement 20% appartenaient à l'espèce *E.aerogenes*. Des données complémentaires obtenues en 1992 par Watanakunakor et al. [22] aux USA ont mis en évidence l'importance d'*E.aerogenes* en pratique clinique. En effet dans cette étude, 43% des cas de pneumopathies nosocomiales identifiées à *Enterobacter* étaient dues à *E.aerogenes*.

- Entre 1993 et 1995, des études françaises ont montré qu'*Enterobacter aerogenes* a été responsable de plusieurs épisodes épidémiques, en particulier en réanimation [43, 44, 47, 74].

Dans une étude faite par Davin-Regli et al. [44] d'Octobre 1992 à Mars 1993, 87 souches d'*Enterobacter aerogenes* ont été isolées à partir de différents produits pathologiques dans une unité de soins intensifs. Elles ont été retrouvées chez 12 patients sur les 187 admis dans l'unité durant cette période. Parmi elles, 41 ont été sélectionnées et typées. Cette bactérie a été à l'origine de dix infections et de nombreuses colonisations. Ces 41 souches ont été étudiées par RAPD, elles ont été classées en 22 types différents.

Des souches de types différents ont été à l'origine de 14 transmissions de patient à patient qui ont impliqué 2 à 5 malades et ont duré de 3 à 15 jours. Aucune souche n'a donné lieu à des transmissions éloignées dans le temps. Les résultats de cette étude suggéraient que l'ensemble de ces infections/colonisations à *E.aerogenes* correspondait à l'évolution et à la transmission de malade à malade de vagues successives de souches différentes ou apparentées responsables d'épidémies de courte durée.

Parmi les 41 souches étudiées, 38 possédaient une BLSE. Ce mécanisme de résistance s'était donc largement généralisé chez *E.aerogenes*. Sur une plus petite population, Grattard et al. [74] firent le même type de constatation par ribotypage.

- Période actuelle :

A partir de 1995, *Enterobacter aerogenes* devient l'une des bactéries les plus fréquemment isolées dans les infections nosocomiales survenant dans les unités de soins intensifs [39]. On la retrouve par vagues épidémiques dans les hôpitaux de Marseille mais aussi dans d'autres hôpitaux français (Bordeaux, Dijon [70], Clermont-Ferrand [49, 101], Limoges [71], Saint-Etienne [74] et Strasbourg [108]). Cette bactérie a également été isolée en Belgique [51, 84], en Autriche [6] et aux Etats Unis [69, 138].

Aujourd'hui, *E.aerogenes* est le troisième pathogène le plus fréquemment isolé du tractus respiratoire dans les services de réanimation, il est aussi fréquemment isolé dans les urines et de la flore digestive en France comme dans d'autres pays [109]. L'émergence de cette espèce semble associée à l'utilisation de techniques médicales invasives, à l'utilisation importante d'antibiotiques à large spectre chez des patients immunodéprimés [35, 43, 44].

Les cas d'infections à *E.aerogenes* ont été longtemps réservés aux services de réanimation, à l'heure actuelle ils touchent d'autres services médicaux [51, 84], en particulier les services de long séjour.

Une étude prospective a été menée à Marseille de Mai 94 à Mai 95 dans deux services de réanimation d'un hôpital [43]. Elle a permis de mettre en évidence les différents modes d'acquisition d'*E.aerogenes*: transmission épidémique de patient à patient d'un clone majoritaire, acquisition endogène de ce pathogène à partir de la propre flore du patient et enfin transmission de patient à patient de types peu fréquents et limités dans le temps et dans l'espace [22].

Durant la période d'étude, il a été constaté que ce clone prévalent était aussi responsable d'infections dans les autres hôpitaux de l'assistance publique de Marseille, à l'hôpital d'Avignon et dans un hôpital militaire de Marseille. Depuis ce clone a été retrouvé à Aix en Provence, Aubagne, Toulon. Cette large diffusion d'un clone majoritaire caractérise aujourd'hui l'importance en clinique d'*E.aerogenes* [22].

- Etude 2000 :

Connaissant l'épidémiologie particulière d'*E.aerogenes* dans la région marseillaise, il semblait nécessaire à Bosi et al. [43] d'envisager la situation au niveau national pour savoir si la diffusion clonale était purement locale ou générale en France.

Une étude nationale a été donc mise en évidence afin de caractériser l'épidémiologie et en particulier la dissémination en France du type prévalant d'*Enterobacter aerogenes* identifié au départ dans les hôpitaux marseillais. Un total de 123 souches d'*E.aerogenes* ont été envoyées par 23 laboratoires hospitaliers à Bosi et al. [23], où ils les ont analysées par RAPD et par ERIC-PCR afin de définir la relation épidémiologique des souches collectées avec le type prévalant.

Le typage moléculaire a permis d'identifier le type prévalent parmi les souches envoyées par 21 des 23 laboratoires; toutes ces souches présentaient un plasmide porteur du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase de type TEM-24, les souches concernées étaient uniquement sensibles à l'imipénème et à la gentamicine. La dissémination du type majoritaire est donc de type clonal et généralisée à toute la France.

Au moment de la publication de ce travail un certain nombre d'études décrivaient la survenue d'épidémies à Bordeaux, Dijon, Clermond-Ferrond, LiMoges, Paris, Saint Etienne et Strasbourg, il est probable que les habitudes de prescription des antibiotiques assez homogènes en France, soient responsables de la dissémination de ce clone.

Par ailleurs, les maisons de retraite ou de longs séjours, dans lesquels séjournent des patients toujours colonisés par *E.aerogenes*, servent de réservoirs et de relais entre les établissements de soins. Ce phénomène semble également concerner la Belgique et l'Autriche qui décrivent des épidémies similaires. Enfin, ils ont pu montrer que 4 souches présentaient une altération des porines de la membrane externe, responsable d'une diminution de la sensibilité des souches aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et à l'imipénème. L'importante dissémination du clone prévalant d'*E.aerogenes* résulte probablement de sa bonne adaptation aux antibiotiques ainsi qu'à l'environnement hospitalier [23].

## 7. INFECTIONS NOSOCOMIALES A *Enterobacter aerogenes*

### 7. 1. Facteurs prédisposants

Le risque de colonisation d'un patient par une bactérie hospitalière dépend des mesures limitant la transmission à partir de réservoirs exogènes mais aussi de la gravité de l'état du patient à l'admission, de l'utilisation de procédure invasives et de la durée de séjour. Il dépend également d'une antibiothérapie permettant la sélection d'une flore sous-dominante de bacille à Gram négatif [67]. *E.aerogenes* profite de la détérioration des mécanismes de défense locale dans l'organisme. Le concept de colonisation correspond actuellement à un état physiologique certe « anormal » mais cependant non pathologique en l'absence de manifestations d'invasion [192].

Les facteurs autres que bactériens prédisposant à l'acquisition d'infection à *Enterobacter* sont classés en facteurs :

- cliniques correspondant à l'état général et aux pathologies existantes du patient (neutropénie [46], cancer [46, 47], brûlures de grande étendue [104, 181], pathologie digestive [47], colonisation cutanée primitive [60],
- thérapeutiques antibiotiques (utilisation des  $\beta$ -lactamines de manière abusive, en particulier les céphalosporines de troisième génération) [25, 33],
- techniques médicales invasives (cathétérisation centrale [135, 179], intubation endotrachéale et ventilation assistée de longue durée [61], opérations et sondage du tractus génito-urinaire [27, 135]

La porte d'entrée au cours des septicémies et par ordre de fréquence : respiratoire (34-40%), abdominale (21-39%), intra-vasculaire (11-40%) et urinaire (13%) [27, 33, 135, 179].

Dans les services de réanimation, la durée de séjour est un facteur de risque de colonisation et d'infection par les bactéries multirésistantes [29, 109]. Pour toutes les bactéries multirésistantes disséminant essentiellement par manuportage, les risques d'acquisition dépendent étroitement du nombre de contacts du personnel avec un patient colonisé ou infecté d'une part et de l'importance des soins apportés aux malades sains d'autre part. [161]

Avant d'être infecté, le malade est le plus souvent colonisé [44]. On distingue trois étapes : tout d'abord la colonisation d'un site par une bactérie communautaire (*E.coli*, pneumocoque,...); puis si le séjour se prolonge la colonisation progressive par une bactérie d'origine nosocomiale par modification de la flore, enfin l'infection nosocomiale.

Dans les études où une recherche systématique de portage a été effectuée par le National Nosocomial Infections Surveillance System entre 1986 et 1990, une colonisation préalable a été notée dans 80 à 100% des cas avant la survenue de l'infection. Parmi les patients de réanimation colonisés par des bactéries multirésistantes, 30 à 60% développent une infection, la fréquence de ces infections dépendant du nombre et de la durée des procédures invasives [44].

## 7. 2. Les différentes infections nosocomiales à *Enterobacter aerogenes*

*Enterobacter aerogenes* est responsable d'infections nosocomiales dont les plus habituelles sont des pneumopathies [61], des infections urinaires et peut être à l'origine de septicémies dont la fréquence relative varie de 3,8% à 6,3% suivant les études [3, 7, 9, 24, 64, 177, 179]. La mortalité associée est de 30 à 42% [27, 152, 179].

*E.aerogenes* peut être également responsable de méningites, le premier cas décrit remontant à 1978 [55], de cellulites [111], d'endophtalmies [115, 152] d'infections ostéo-articulaire, de péritonites et de suppuration diverses [22, 152]. On la retrouve actuellement avec une forte prévalence dans les unités de pédiatrie comme colonisant du tractus urinaire.

### ▪ Septicémie et infection du cathéter :

La septicémie est le plus souvent secondaire à un foyer primitif responsable de décharge bactérienne (peau, tube digestif, voies biliaires, poumons, endocardie, voies génito-urinaires, systèmes nerveux central, os) [5]. En dehors de ces cas, il s'agit le plus souvent d'une infection du cathéter [174], plus d'un tiers des bactériémies nosocomiales (37,1%). Quelques fois la porte d'entrée reste inconnue. Dans ce cas la mortalité est plus élevée [147, 174]. *E.aerogenes* est la cinquième cause de septicémies nosocomiales aux USA, 5 à 7% [185, 152].

La démarche diagnostique doit être systématique et repose sur l'examen clinique, l'imagerie et les prélèvements microbiologiques [5].

Les infections sur cathéter, fréquentes, représentent 15% des infections nosocomiales, doivent être envisagées devant tout syndrome septique survenant chez un patient porteur d'un cathéter vasculaire [146].

L'infection peut être locale (concernant le cathéter lui-même) ou générale (bactériémie dont le cathéter constitue la porte d'entrée) [5, 146]. 3 à 7 des cathéters vasculaires se compliquent d'une infection, ce taux n'est que 1 à 2% en ce qui concerne les cathéters implantables de longue durée. Les micro-organismes les plus fréquemment responsables d'infection sur cathéter sont les Staphylocoques coagulase négative (*Staphylococcus epidermis* en 1<sup>er</sup> lieu) et les *Staphylococcus aureus*. En second lieu viennent les bacilles à Gram négatif (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*...) et chez les patients présentant une immunodépression, les levures (*Candida spp.* essentiellement) [5, 146].

Le diagnostic est suspecté sur des signes cliniques d'infection locale : pus autour de l'orifice cutané du cathéter, cellulite le long d'un trajet sous cutané de tunnélisation, et d'infections systémiques : fièvre ou hypothermie, frissons, hypotension artérielle.

L'absence d'autres causes de sepsis, la résistance de l'infection au traitement antibiotique, la disparition des symptômes dans les 48 heures suivant l'ablation du cathéter sont des éléments évocateurs de septicémie sur cathéter.

La confirmation du diagnostic repose sur la réalisation d'hémocultures périphériques et sur le cathéter répétées et sur la mise en culture du cathéter [5, 146].

- Infection pulmonaire (pneumopathie) :

Les pneumopathies nosocomiales sont des infections acquises dans un établissement de soins plus de 48 heures après l'admission. La contamination se fait essentiellement par voie aérienne et le plus rarement par inhalation. Elle représente une cause importante de mortalité en secteur de réanimation. La pneumopathie peut être lobaire ou alvéolaire [146, 152].

Le diagnostic microbiologique repose sur les hémocultures en période fébrile et l'examen bactériologique des crachats. Cependant cet examen reste toujours difficile à affirmer. La colonisation des voies aériennes est constante au bout de huit jours de ventilation.

En effet, il existe des modifications de l'épithélium de surface favorisant l'adhérence des bactéries pathogènes par le biais d'une activité protéolytique salivaire accentuée, d'une déplétion en fibronectine à la surface de l'épithélium associée à des modifications de l'effet de barrière des germes saprophytes oropharyngés sur l'action des antibiotiques et des déficits locaux en facteur de défense (Ig A, lysozyme) [5].

▪ Infection urinaire :

C'est l'infection nosocomiale la plus fréquente, dont le principal facteur de risque est le sondage vésical à demeure. C'est la présence à l'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) d'au moins  $10^5$  bactéries/ ml indépendamment des signes cliniques infectieux et de l'existence d'une pyurie. Les taux les plus élevés se retrouvent en réanimation. Les infections urinaires nosocomiales sont la cause d'environ 5% des bactériémies nosocomiales, elles représentent le principal réservoir de micro-organismes hospitaliers et surtout de bactéries multirésistantes [5, 152].

La colonisation urinaire représente actuellement, le principal réservoir d'*E.aerogenes* chez les personnes âgées en unités de long séjour et qui peut donner lieu à des infections urinaires dans ces services ou au cours d'une réhospitalisation.

▪ Cystite nosocomiale :

Il s'agit d'une infection urinaire basse (infection des urines de la vessie) survenant chez des patients homme ou femme avec un terrain particulier tel que l'obstacle sur les voies urinaires (calculs, adénomes de la prostate ou anomalie congénitale de l'appareil urinaire), ou une maladie générale prédisposante telle que le diabète, la drépanocytose ou la polykystose rénale. Cette infection est acquise à l'hôpital et elle est essentiellement représentée par des infections sur sondes urinaires (80%). La cystite nosocomiale à *E.aerogenes* est très fréquente (40%) [146].

## **8. RESISTANCE D'*Enterobacter aerogenes* AUX ANTIBIOTIQUES**

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, ce qui implique qu'on tienne compte dans la prescription des données pharmacologiques telle que la pathologie, la voie d'introduction, la diffusion tissulaire et le métabolisme de la molécule.

Il doit ensuite pénétrer dans la bactérie, n'y être ni détruit ni modifié, se fixer à une cible et perturber ainsi la physiologie bactérienne. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie l'antibiotique, même correctement administré se révèle inefficace. Ce phénomène appelé résistance est lourd de conséquences et doit être si possible, dépisté au laboratoire [186].

## 8. 1. Les types de résistance

Il existe deux types de résistance :

- ✓ Résistance naturelle ; programmée sur le génome bactérien, donc fixe et constante à l'intérieur du taxon. A ce titre, elle constitue un critère d'identification [186].
- ✓ Résistance acquise ; consécutive à des modifications de l'équipement génétique chromosomique ou plasmidique. Elle ne concerne que quelques souches d'une même espèce mais peut s'étendre : - sa fréquence varie dans le temps mais aussi dans l'espace – région, ville, hôpital ou même service. Elle constitue un marqueur épidémiologique [186].

## 8. 2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les  $\beta$ -lactamines et les aminosides sont les antibiotiques les plus utilisés en thérapeutique hospitalière seuls ou le plus souvent associés aux fluoroquinolones dans le traitement des infections sévères à *E.aerogenes*.

### 8. 2. 1. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

La famille des  $\beta$ -lactamines comprend un grand nombre de molécules, le représentant le plus ancien étant la pénicilline G [113, 167]. Toutes partagent une structure commune, le cycle  $\beta$ -lactame, structure chimique indispensable à l'activité antibiotique. Sont classées en quatre grands groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes (dont l'imipénème) et les monobactames (dont l'aztréonam).

Les  $\beta$ -lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, plus précisément la formation des ponts interpeptidiques, leurs cibles étant les PLP.

Les  $\beta$ -lactamines n'ont pas à traverser la membrane cytoplasmique pour accéder à leurs cibles, puisque celles-ci sont situées à la face externe de la membrane cytoplasmique.

Par ailleurs, la plupart d'entre elles (exceptés les pénicillines G, V et M) ont un degré d'hydrophilie et une taille leur permettant de franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif par la voie des porines. Les  $\beta$ -lactamines présentent une analogie de structure avec le dipeptide terminal D-alanine- D-alanine faisant partie du pentapeptide qui constitue le substrat naturel des transpeptidases et, accessoirement, des carboxypeptidases [167].

L'antibiotique est donc capable de se lier au site actif de l'enzyme; il y a alors ouverture du cycle  $\beta$ -lactame et formation d'un complexe covalent dont la durée de vie est longue. A l'inverse, quand ce complexe n'est pas stable, la PLP se comporte alors comme une  $\beta$ -lactamase; l'antibiotique est alors hydrolysé et l'enzyme restitué sous forme active [54, 112].

L'effet direct de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane due aux  $\beta$ -lactamines est l'arrêt de la croissance bactérienne, ou bactériostase. Or ces antibiotiques ont habituellement un effet bactéricide sur les bactéries sensibles. L'action bactéricide des  $\beta$ -lactamines se manifeste le plus souvent par une dégradation du peptidoglycane conduisant à une lyse de la bactérie. L'effet des  $\beta$ -lactamines serait :

- de déréguler l'activité des autolysines et d'induire ainsi l'autolyse de la paroi (dégradation progressive et rapide du peptidoglycane),
- de sensibiliser la  $\beta$ -lactamine aux variations de pression osmotique en créant un peptidoglycane fragile.

### 8. 2. 2. Mécanisme d'action des Quinolones

On distingue les produits les plus anciens, comme l'acide nalidixique, actifs uniquement sur les bacilles à Gram négatif, et les fluoroquinolones (leur formule incluant un atome de fluor et un cycle pipérazine) douées d'une activité antibactérienne plus élevée et d'un spectre plus large [167].

Ces molécules pénètrent dans le cytoplasme bactérien par diffusion passive et vont agir sur leur cible spécifique, l'ADN gyrase. Cette enzyme possède une structure tétramérique codée par les gènes *gyrA* et *gyrB*. L'ADN gyrase fait partie du groupe des topo-isomérases, enzymes qui modifient le degré de torsion de l'ADN.

L'ADN bactérien est naturellement légèrement surenroulé négativement ; cet état facilitant la séparation des deux brins de la double hélice, préalable à la réplication et à la transcription.

L'ADN gyrase est la seule topo-isomérase bactérienne capable de surenrouler négativement l'ADN. Cette action de la gyrase est ATP-dépendante. Au moment de la formation de la coupure double-brin, l'ADN et la gyrase sont liés de manière covalente. La cible des quinolones est ce complexe covalent ADN-enzyme normalement transitoire mais qui est stabilisé par l'antibiotique. Il y a donc formation d'un complexe ternaire ADN - gyrase - quinolone, le fonctionnement de l'enzyme est inhibé et elle reste fixée sur l'ADN. De plus la coupure double-brin de l'ADN n'est pas réparée [167].

Les quinolones sont aussi capables d'inhiber une deuxième topo-isomérase bactérienne, l'ADN topo-isomérase IV, qui présente des homologies structurales avec l'ADN gyrase [167]. Son rôle physiologique essentiel *in vivo* est la décaténation, qui permet notamment la séparation des deux ADN fils en fin de réplication. L'inhibition de cette enzyme semble aussi intervenir dans l'activité antibactérienne des quinolones.

Le complexe ternaire ADN-enzyme-quinolone agit en fait comme un « poison » en bloquant la progression sur l'ADN des ADN- et ARN- polymérases bactériennes, d'où arrêt de la réplication et de la transcription et donc inhibition de croissance [182]. Ainsi, l'inhibition d'une minorité des molécules de gyrase présentes dans la bactérie suffit à inhiber la croissance bactérienne.

L'action bactéricide des quinolones serait déclenchée par la dissociation secondaire de l'ADN et de l'enzyme au niveau du complexe de clivage, sans que la coupure double-brin puisse être réparée. La présence de ces lésions irréversibles de l'ADN qui étaient auparavant masquées par la fixation à l'enzyme, déclencherait des phénomènes secondaires encore mal connus, liés à l'activation de certaines synthèses protéiques et aboutissant à la mort de la bactérie [54, 167].

Les quinolones possèdent donc deux cibles intracellulaires. Il semble toutefois que pour la plupart des espèces bactériennes, l'une des deux constitue la cible préférentielle. La gyrase apparaît comme la cible primaire pour les bacilles à Gram négatif.

### 8. 2. 3. Mécanismes d'action des aminosides [167, 182]

Ceux sont des sucres ou sucres aminés et polycationiques. Le ribosome constitue leur cible principale, mais les aminosides ont aussi une action au niveau des membranes externe et cytoplasmique et au niveau du complexe d'initiation de la réplication de l'ADN.

De par leur structure polycationique, les aminosides sont capables de perturber l'organisation membranaire du LPS et de promouvoir ainsi leur propre passage à travers la membrane externe. Le passage de aminosides à travers les porines est possible. Le transport des aminosides hydrophiles à travers la membrane cytoplasmiques nécessite de l'énergie. Il se fait en deux phases ("Energy Dependent Phase" ou EDP). La première phase (EDP I) aboutit à une accumulation lente et a un effet bactériostatique. Pendant la seconde phase (EDP II), les aminosides s'accumulent rapidement et ont un effet bactéricide. Classiquement on considère que les aminosides ayant pénétré la cellule pendant EDP I seraient responsables d'erreurs de lecture au cours de la traduction de l'ARNm qui conduiraient à la synthèse de protéines de membranes anormales. Ces protéines donneraient naissance à des canaux non spécifiques qui seraient empruntés par les aminosides lors de la phase de pénétration accélérée EDP II.

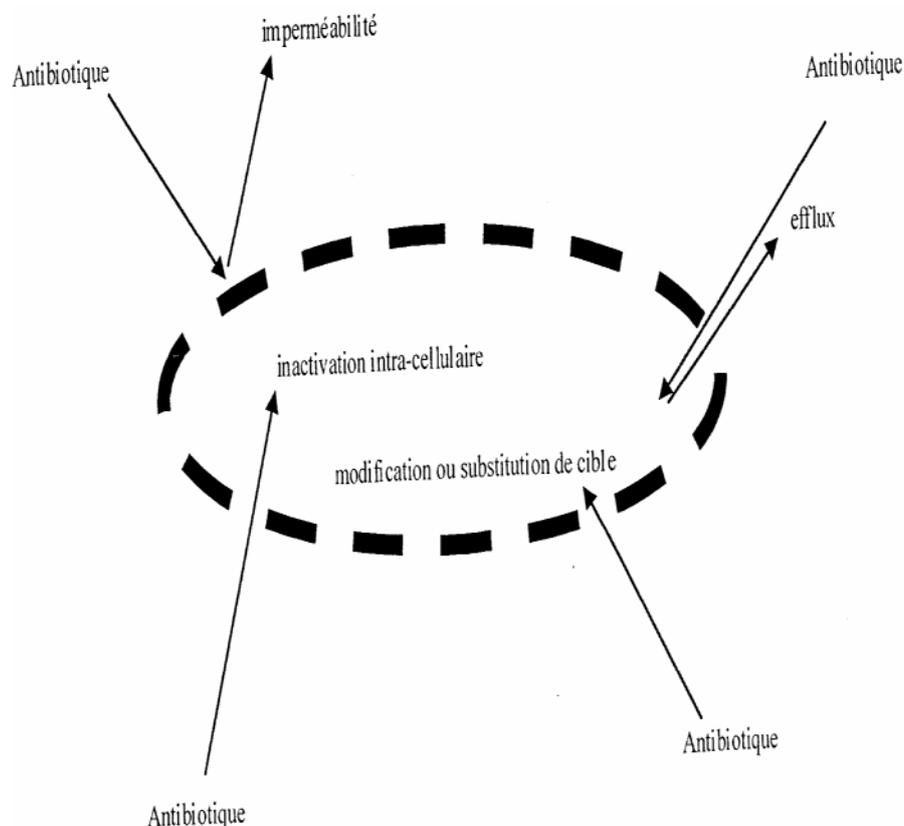
En ce qui concerne l'action des aminosides sur le ribosome, il est admis que les différents aminosides n'ont pas les mêmes sites de fixation. Cette fixation va dans tous les cas engendrer des distorsions au niveau de la structure du ribosome et aura pour conséquence une altération de toutes les étapes de la traduction de l'ARNm. La bactéricidie de cette classe d'antibiotiques semble être principalement due à deux processus : perte de l'intégrité membranaire (par incorporation de protéines anormales) et blocage complet des synthèses protéiques [54].

### 8. 3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Actuellement, différents mécanismes de résistance sont décrits chez *E.aerogenes* et sont classés en quatre catégories (**Figure 10**).

Ces mécanismes ont un impact sur la fréquence des étapes bactériennes responsables des infections surtout des infections nosocomiales [32, 56, 85, 103, 133];

- inactivation enzymatique
- altération de la perméabilité membranaire
- mécanisme d'efflux
- modification de la cible d'antibiotique



**Figure 10** : Mécanismes de résistance aux antibiotiques [22]

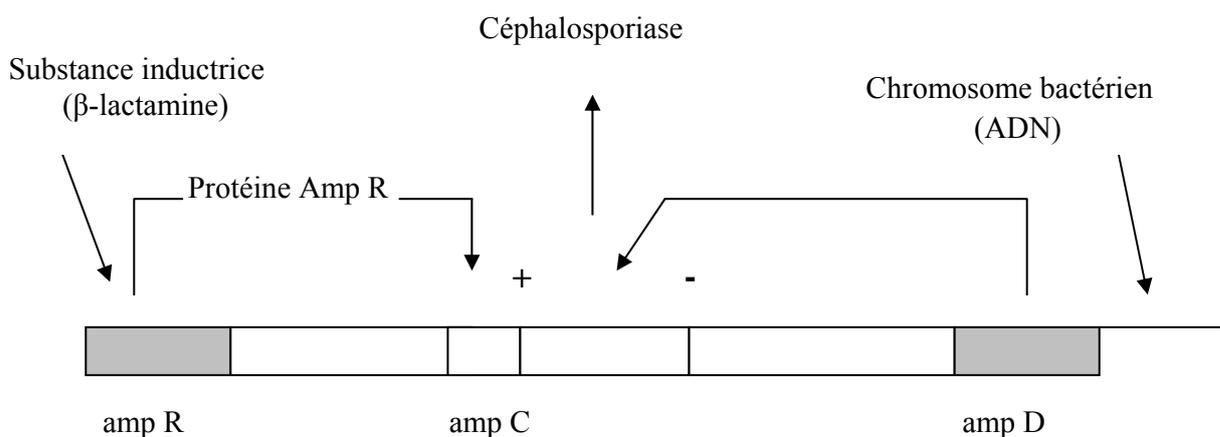
### 8. 3. 1. Inactivation enzymatique

#### 8.3.1.1. Inactivation des $\beta$ -lactamines

Il existe plusieurs systèmes enzymatiques responsables de la dégradation des  $\beta$ -lactamines chez *E.aerogenes* :

- ✓ une pénicillinase chromosomique de bas niveau présente chez toutes les souches sauvages d'*E.aerogenes*.
- ✓ une céphalosporinase chromosomique inductible qui peut être de bas ou de haut niveau. Les premières sont responsables de la résistance aux céphalosporines de première génération [162] et les secondes inactivent toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème [151]. Les céphalosporinases de haut niveau sont induites par les céphalosporines de troisième génération [72, 81]. Les  $\beta$ -lactamases AmpC sont présentes chez de nombreuses bactéries à Gram négatif qui possèdent un gène chromosomique ampC qui code pour cette enzyme qui hydrolyse les céphalosporines et les pénicillines.

Ces  $\beta$ -lactamases sont produites en petite quantité et n'entraînent pas de résistance significative, mais certaines espèces d'*Enterobacter* peuvent produire des quantités plus importantes d'enzymes. Cette capacité résulte de la mutation chromosomique du gène ampD (qui normalement inhibe l'expression de ampC) et donc entraîne l'hyperproduction de la bêta-lactamase AmpC (**Figure 11**).



**Figure 11** : Contrôle génétique de la production de céphalosporinase

Le cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines est coupé par l'enzyme et ne peut donc plus se fixer sur les PLP [37].

- ✓ des céphalosporinases dérégulées de haut niveau, communes à la plupart des entérobactéries retrouvées au niveau du tractus gastro intestinal [123, 178]. Elles sont d'origine plasmidique et se transmettent facilement. La prévalence des micro-organismes gastro-intestinaux exprimant ce type de résistance est élevée. Ces enzymes sont responsables de la résistance à l'ensemble des céphalosporines ainsi qu'aux céphamycines [61, 123, 151].
- ✓ des carbapénémases chromosomiques responsables d'une résistance sélective à l'imipénème. Elles sont inductibles par la céfoxitine et l'imipénème [49, 169, 173]. Ce mécanisme est rare chez *E.aerogenes*.
- ✓ une nouvelle carbapénémase (carbapénémase sans cofacteur métallique de classe A (NMC-A)) a été récemment mise en évidence chez *E.cloacae* [121]. Cette enzyme est active à la fois sur les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes.
- ✓ des  $\beta$ -lactamases plasmidiques à spectre élargi responsables de la résistance à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines sauf : céphamycines (céfoxitine, céfotétan), latamoxef et imipénème [47, 50, 86, 131, 136, 162].

En 1989 [59], sont apparues les premiers cas d'infections nosocomiales dues à des souches possédant une  $\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE), ces BLSE entraînent une résistance aux céphalosporines de troisième génération [164].

L'acquisition de la résistance est réputée se faire in vivo dans les dix jours qui suivent l'instauration d'une antibiothérapie [34]. Les céphalosporines de troisième génération sont responsables de leur apparition dans 69% des cas [156].

### 8. 3. 1. 2. Inactivation des aminosides

Des aminoglycosides acétyltransférases (AAC), des phosphotransférases (APH) et des nucléotidyl transférases (ANT) inactivent les aminosides. La répartition de ces enzymes varie selon les espèces bactériennes. Cette résistance est largement disséminée par des gènes localisés sur des plasmides. Chez *E.aerogenes*, elle est associée à la production de BLSE de type TEM24. C'est le phénotype KTNA (résistance à kanamycine, tobramycine, nétilmicine, et amikacine et sensibilité à la gentamicine) [37, 80].

### 8. 3. 2. Altération de la perméabilité membranaire

Parallèlement à cette barrière enzymatique, la bactérie peut adopter une attitude plus passive mais tout aussi efficace. Certaines souches de *Enterobacter* isolées en clinique manifestent une résistance pour les  $\beta$ -lactamines qui s'accompagne de la diminution ou de la perte, d'une ou plusieurs protéines de la membrane externe identifiées aux porines [23, 31, 120]. L'altération de l'expression des porines entraîne la diminution notable de la quantité intracellulaire de l'antibiotique; cette dernière peut alors passer sous le seuil de concentration requis pour l'action bactériostatique et se traduire par une augmentation sensible des CMI.

Dans le **Tableau 3**, figurent les CMI de souches de *E.aerogenes* isolées chez deux patients avant, pendant et après traitement par l'imipénème [16]. Dans le cas de certaines  $\beta$ -lactamines, comme les carbapénèmes, la résistance par imperméabilité a été rapportée à plusieurs reprises chez *Enterobacter* [173, 178].

Enfin, une altération plus importante de la structure de l'enveloppe ou une modification du lipopolysaccharide, suite à une mutation pléiotropique, serait impliquée chez certaines souches.

Actuellement, l'imperméabilité est un avantage certain pour la bactérie. En effet, conjuguée avec l'expression d'une céphalosporinase, elle assure une protection à bas coût énergétique envers les céphalosporines. Par ailleurs, la diminution de la perméabilité toucherait également les nouvelles quinolones ainsi que d'autres classes d'antibiotiques (aminosides, triméthoprime et chloramphénicol) [22].

A côté de cette régulation de l'expression des porines, une nouvelle réponse se dégage. Un isolat vient d'être récemment étudié au laboratoire, il produit une porine différente qui par ces caractéristiques altérées au niveau du pore, empêcherait la pénétration des  $\beta$ -lactamines [32]. Cette porine pourrait être un analogue de celle récemment rapportée chez *Klebsiella pneumoniae* [50].

**Tableau 3 :** Evolution des CMI d'isolats d'*Enterobacter aerogenes* chez deux patients I et II, avant, pendant et après traitement par l'imipénème d'après Bornet et al. [20].

Patient 1 : souche A avant traitement, souches B, C, D et E après traitement à l'Imipénème.

Patient 2 : souche F avant traitement, G, H, I et J après le premier traitement, K et L après un deuxième traitement à l'imipénème, M après arrêt du traitement .

	CMI					
	FEP*	CPO	IMP	CIP	Cm	TET
<b>Patient I</b>						
A	1	1	1	2	8	1
B	64	64	16	32	256	4
C	8	8	2	32	256	4
D	16	16	2	32	256	8
E	64	64	16	64	256	16
<b>Patient II</b>						
F	2	2	1	128	512	4
G	32	32	32	128	512	16
H	16	16	4	128	256	4
I	128	128	8	128	512	16
J	2	2	1	64	256	2
K	64	64	8	128	512	8
L	32	32	16	128	256	4
M	4	4	2	64	256	8

\* FEP : céfépime, CPO : céfpirome, IMP : imipénème, CIP : ciprofloxacine, Cm : chloramphénicol, TET : tétracycline.

### 8. 3. 3. Mécanisme d'efflux

Dans ce cas, l'antibiotique pénètre normalement dans la bactérie jusqu'au cytoplasme. Mais à ce niveau, il est rejeté à l'extérieur de la cellule par un mécanisme de transport actif. Il est pris en charge par une protéine de transport énergie-dépendant au niveau de la membrane interne, puis par une protéine de liaison au niveau du périplasma puis par une troisième protéine canal, au niveau de la membrane externe. Ce système dépend de la protéine MarA qui active les promoteurs des gènes codant pour les transporteurs qui participent au mécanisme d'efflux [103, 133, 158].

Ce mécanisme concerne les quinolones, les tétracyclines et le chloramphénicol, les aminosides (chez *P.aeruginosa*) et les  $\beta$ -lactamines [128].

### 8. 3. 4. Modification de la cible de l'antibiotique

#### ➤ **Quinolones**

Il peut exister une résistance sélective des souches vis à vis des fluoroquinolones par modification de leur cible, l'ADN-gyrase (mutation dans la région QRDR). Les quinolones ne reconnaissent plus leur cible et sont donc inactives [54, 85].

#### ➤ **Aminosides**

Il peut s'agir d'une modification de la cible ribosomiale. Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomiale entraîne une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour le ribosome. Ce type de résistance apparaît spontanément par mutation. Pour obtenir une résistance clinique, il faut des mutations multiples, ce qui explique la rareté de ce mécanisme de résistance [37, 80].

## 8. 4. Résistance multiple aux antibiotiques (Multi Drug Resistant) (MDR)

### 8. 4. 1. Généralités

Depuis des milliards d'années, les bactéries doivent mettre en oeuvre pour assurer leur survie des mécanismes de résistance à différents agents toxiques (dits antimicrobiens) comme à des conditions environnementales défavorables. La plupart des gènes qui confèrent cette résistance figurent sur des éléments génétiques mobiles : plasmides, séquences d'insertion, transposons. Les agents antimicrobiens ne sont pas responsables de leur formation, mais en exerçant une pression de sélection, ils sont à l'origine de l'émergence des bactéries qui les hébergent. L'avantage sélectif conféré est fonction du nombre de gènes transférés simultanément : il n'est pas rare que les plasmides portent 5 ou 6 gènes différents (par exemple un ou deux gènes de résistance aux métaux lourds, une ou deux  $\beta$ -lactamases, une acétyl transférase permettant de résister aux amino-glycosides, un gène *tet* de résistance aux tétracyclines...) [14, 85, 95, 103, 133, 158].

Ces éléments génétiques mobiles sont disponibles pour les autres espèces bactériennes présentes dans leur environnement. Par transposition, ils peuvent gagner des bacilles à Gram négatif, à qui ils conféreront les mêmes mécanismes de résistance aux antimicrobiens. Normalement, et si ces bactéries n'en n'ont pas l'utilité, ces transferts ne se transmettront pas à leur descendance.

Les entérobactéries résistantes, responsables d'infections nosocomiales, particulièrement dans les services de soins intensifs tirent un avantage sélectif décisif de ces éléments, puisés dans le génome global. Chez ces bactéries, l'acquisition d'une BLSE participe à l'expression d'une multi-drug résistance associée aux mécanismes d'imperméabilité et l'efflux [172]. Dans ce cas, les plasmides portent aussi plusieurs gènes de résistance, ce qui se traduit par un phénotype de sensibilité limité à l'imipénème et à la gentamicine [57].

## 8. 4. 2. Aspects physiologiques de la Multi-Drug Résistance

### 8. 4. 2. 1. Régulation de l'expression des porines

Chez la bactérie, le contrôle des échanges avec le milieu externe fait intervenir de nombreux gènes, éléments de régulation (répresseur, activateur, ...), ainsi que de nombreuses protéines membranaires (porines, pompes, ...) assurant la diffusion de part et d'autre des deux membranes externes ou internes. De nombreux travaux ont mis en évidence les mécanismes de régulation et d'expression des porines de *E.coli* [14, 102, 133]. Le premier mécanisme décrit est le mécanisme physiologique dépendant de l'osmorégulation. Il s'agit d'une régulation transcriptionnelle qui intervient *via* l'opéron *ompB*. Par ailleurs, un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle faisant appel à l'ARN *micF* a également été décrit. Ces systèmes modulent l'expression des porines OmpC et OmpF en fonction des conditions de l'environnement (osmolarité, pH, température) et assurent la production de la porine la plus performante en fonction du milieu. D'autres mécanismes *via* les *loci mar*, *omp*, *sox*, *tol...*, régulent l'expression en réponse à divers stimuli externes. Leur intervention se traduit par une baisse modulable de la synthèse des porines [164, 165]. Cette diminution peut conduire à la disparition totale des porines à la surface de la membrane externe.

### 8. 4. 2. 2. Modification de la perméabilité

L'opéron *mar* composé des gènes *marA*, *marB*, *marO* et *marR* est responsable du phénotype MDR chez *E.coli* [4]. A l'état normal, la protéine MarR joue le rôle de répresseur et se fixe sur le gène opérateur *marO* bloquant ainsi la transcription des gènes *marA* et *marB*. Mais une mutation sur *marO*, ou l'action d'un inducteur comme le salicylate ou les  $\beta$ -lactamines va lever la répression [22].

L'expression des gènes *marA* et *marB* pourra donc se faire. Le gène *marA* est alors traduit en protéine MarA. Cette dernière active l'ARN antisens *micF* qui se fixe sur l'ARN m produit par *ompF* en empêchant sa traduction, ce qui bloque l'expression de la porine *OmpF*. La perte de la porine empêche entre autre la pénétration des  $\beta$ -lactamines qui utilisent cette voie de diffusion. C'est le cas également du chloramphénicol.

Le coût énergétique du système est faible puisque la régulation utilise des voies existantes, avec la possibilité de revenir facilement à une situation antérieure. La reprise de la production des porines en absence d'antibiotiques permet à la bactérie de rétablir l'entrée des métabolites et de reprendre une croissance normale. Dans un environnement donné, la bactérie émergente est celle qui utilise au mieux les différents systèmes de régulation génétique et les shunts entre les différentes cascades physiologiques face à tous les agents toxiques.

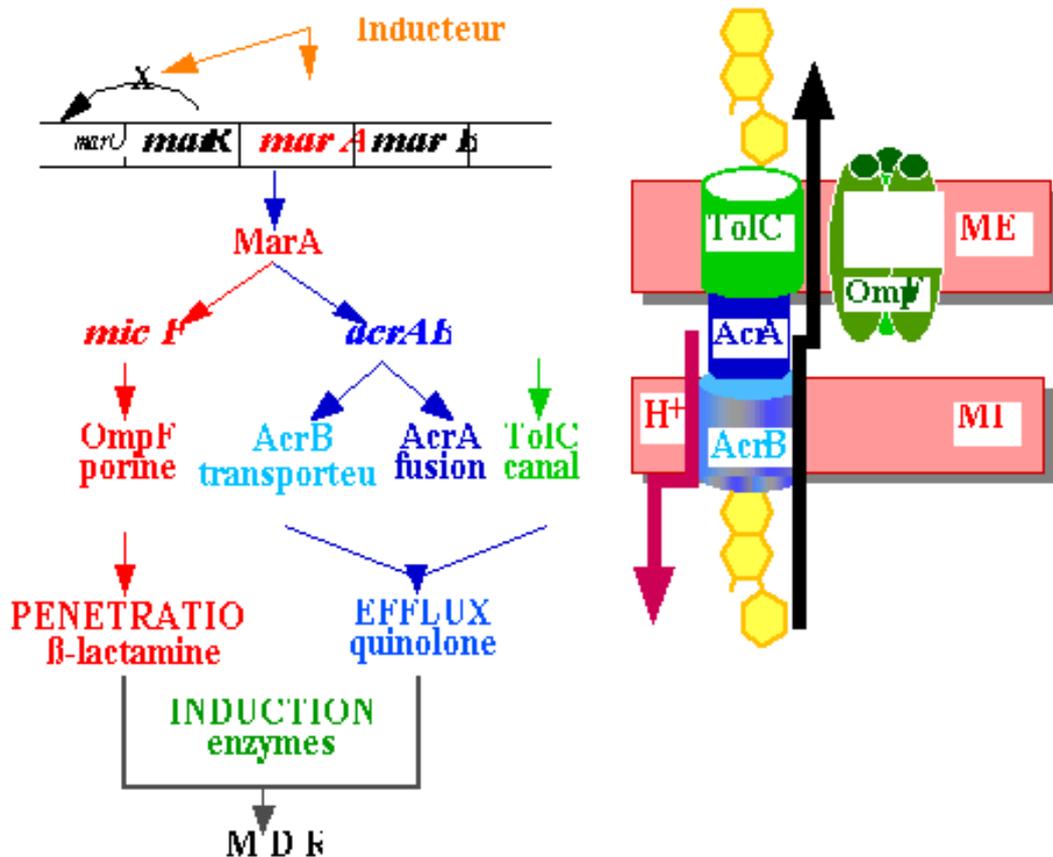
#### 8. 4. 2. 3. Mécanisme d'efflux

Le mécanisme d'efflux comporte une pompe insérée dans la membrane plasmique associée ou non à un transporteur capable d'expulser à travers la membrane les tétracyclines, quinolones et chloramphénicol. Ces systèmes d'efflux sont mis en place après activation du système Mar. La protéine MarA active l'opéron *acrAB* composé des gènes *acrA* et *acrB*. Ces derniers sont traduits en protéines AcrA et AcrB. Ces molécules se situent respectivement au niveau du périplasme et de la membrane interne et sont associées à la protéine TolC et forment ainsi le complexe d'efflux. Le transporteur AcrB prend en charge l'antibiotique et l'expulse par le canal TolC (**Figure 12**).

En présence d'un inducteur, une cascade de régulateurs puis une série de gènes vont activer les éléments de la pompe et en parallèle diminuer la perméabilité de la membrane, favorisant l'induction d'enzymes dont les BLSE.

L'effet direct de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane due aux  $\beta$ -lactamines est l'arrêt de la croissance bactérienne, ou bactériostase. Or ces antibiotiques ont habituellement un effet bactéricide sur les bactéries sensibles. L'action bactéricide des  $\beta$ -lactamines se manifeste le plus souvent par une dégradation du peptidoglycane conduisant à une lyse de la bactérie. L'effet des  $\beta$ -lactamines serait de

- déréguler l'activité des autolysines et d'induire ainsi l'autolyse de la paroi (dégradation progressive et rapide du peptidoglycane),
- sensibiliser la  $\beta$ -lactamine aux variations de pression osmotique en créant un peptidoglycane fragile.



**Figure 12** : Mécanisme de résistance multiple aux antibiotiques [132]

En ce qui concerne l'action des aminosides sur le ribosome, il est admis que les différents aminosides n'ont pas les mêmes sites de fixation. Cette fixation va dans tous les cas engendrer des distorsions au niveau de la structure du ribosome et aura pour conséquence une altération de toutes les étapes de la traduction de l'ARNm. La bactéricidie de cette classe d'antibiotiques semble être principalement due à deux processus : perte de l'intégrité membranaire (par incorporation de protéines anormales) et blocage complet des synthèses protéiques modulable de la synthèse des porines. Cette diminution peut conduire à la disparition totale des porines à la surface de la membrane externe.

## 8. 5. Situation actuelle

A l'heure actuelle, les souches d' *Enterobacter aerogenes* responsables d'épidémies à l'hôpital présentent un phénotype de multi- résistance aux antibiotiques [16].

Lors de l'apparition des premières épidémies à *E.aerogenes*, les souches possédaient une BLSE les rendant résistantes aux  $\beta$ -lactamines sauf imipénème, latamoxef, céphamycines. Chez *E.aerogenes* la BLSE la plus fréquemment rencontrée est TEM-24. L'existence de cette BLSE rend *E.aerogenes* également résistant aux aminosides sauf la gentamicine, encore préservée peut être du fait d'une utilisation restreinte dans le sud est de la France. Ensuite, est apparue une résistante des souches vis-à-vis des fluoroquinolones (modification de leur cible). Ce phénomène s'explique peut être par l'utilisation importante des fluoroquinolones en France.

Depuis 1995 est apparue une céphalosporinase dérégulée active sur tous les  $\beta$ -lactamines cités ci-dessus excepté l'imipénème. La sensibilité à la colistine reste inchangée (**Tableau 4**) [22].

Ensuite, sont apparues des souches résistantes à l'imipénème par imperméabilité. Aujourd'hui 4 à 5% des souches d'*E.aerogenes* isolées en clinique sont résistantes à l'imipénème [123]. Cette mutation est en relation avec l'utilisation de l'imipénème qui augmente la sélection des mutants résistants au cours du traitement [20, 145]. La résistance aux quinolones par mécanisme d'efflux est aussi présente, son incidence clinique est inconnue à l'heure actuelle.

Ils ont pu noter une augmentation toujours croissante de la résistance aux antibiotiques d'*E.aerogenes* à partir des années 1980 (**Tableau 4**).

### 8. 5. 1. Stratégie thérapeutique et politique de prévention

#### ↳ Maîtrise des prescriptions antibiotiques

Le choix des antibiotiques et leurs modalités de prescriptions peuvent être envisagés à des échelons différents [53].

A l'échelon du patient, il existe des données cliniques concernant des échecs thérapeutiques lors d'infections nosocomiales à *Enterobacter spp.* [53]. L'évaluation du taux d'échec lié à la sélection de souches résistantes par un traitement par des céphalosporines de troisième génération est de l'ordre de 20% (18-24%) [53].

**Tableau 4** : Evolution de la résistance des souches hospitalières d'*E.aerogenes* de 1980 à 1999 [22].

Année	1980	1993	1995	1999
<b>β-lactamines</b>				
- Pénicillines	R (1)	R (2)	R (2) + (4)	R(2) + (4)
- Peni + Inhibiteur	R	R	R	R
- C1G	R	R	R	R
- C2G	S	R	R	R
- C3G	S	R	R	R
- Céphamycines	S	S	R	R
- Imipénème	S	S	S	R (6)
<b>Aminosides</b>	S	S	R(5)	R(5)
- Gentamicine	S	S	S	S
<b>Fluoro-quinolones</b>	S	R (3)	R (3)	R (3) + (7)
<b>Colistine</b>	S	S	S	S

S : sensible, R : résistant, (1) pénicillinase de haut niveau, (2) β-lactamase à spectre élargie, (3) modification de l'ADN-gyrase, (4) céphalosporinase déréprimée, (5) Aminoglycoside acethyltransférerase (AAC) (6) imperméabilité membranaire, (7) mécanisme d'efflux.

Il existe aussi des échecs thérapeutiques semble t-il liés à l'utilisation des fluoroquinolones [57]. En 1997, Davin-Regli et al ont décrit une épidémie à *E.hormachaei* dans plusieurs services d'un hôpital marseillais [45]. Les patients chez qui ce pathogène peu fréquent a été isolé avaient uniquement en commun la mise en place d'un traitement antibiotique par les fluoroquinolones dans les jours précédents l'identification du micro-organisme. La restriction d'utilisation de cette molécule s'est accompagnée d'une disparition de l'isolement de ce pathogène dans cet établissement.

Le mécanisme de la sélection des mutants résistants par les antibiotiques n'est pas clairement défini, et fait sans doute partie d'un phénomène multifactoriel dont les antibiotiques ne représentent qu'une composante majoritaire ou non en fonction de l'antibiotique et de la bactérie concernée [2]. Les conditions d'émergence d'*Enterobacter aerogenes* sont encore inconnues.

Mais l'importance que peut avoir une molécule antibiotique pour exercer une pression de sélection sur les quelques individus résistants d'une population et pour favoriser leur émergence au détriment des autres bactéries sensibles est indéniable. Aussi, nombreux sont les cliniciens qui s'interrogent sur la pertinence des administrations d'antibiotiques précoces dès la mise en évidence d'une colonisation. On se place en effet dans les conditions théoriques optimales de sélection des bactéries résistantes.

A l'échelon de la collectivité, les paramètres à prendre en compte sont différents: on doit s'attacher à la fois à l'émergence d'une souche résistante chez un patient mais aussi à la diffusion de cette souche chez d'autres patients. Les souches responsables d'infections nosocomiales sont en général plus résistantes et de traitement plus difficile, d'où le danger de leur propagation épidémique. La décontamination et le traitement des colonisations sont théoriquement envisageables sous cet angle, mais restent encore très controversées. La mise en place de mesures d'isolement est systématiquement recommandée [189, 190].

Il semblerait qu'il existe pour certains antibiotiques une relation de cause à effet entre le type d'antibiotique prescrit, son volume de prescription et le niveau de résistance bactérienne [2, 30, 53]. Flynn et al.[61] ont montré une corrélation entre un traitement par une céphalosporine de première génération et une colonisation pharyngée par *E.cloacae*.

Prévot et al. [143] ont mis en évidence le même phénomène concernant le portage et la colonisation par *Enterobacter spp.* résistants au céfotaxime chez des patients recevant cet antibiotique. L'utilisation d'une molécule antibiotique donnée peut résulter en une colonisation par une espèce ou une souche d'une espèce donnée résistante à la molécule prescrite.

White et al.[181] ont montré que cette pression de sélection semble réversible. Dans leur étude, ils ont obtenus une réversibilité de la résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux fluoroquinolones des entérobactéries par maîtrise médicalisée de la prescription. Cette récupération de la sensibilité ne se faisait ni au détriment de la qualité des soins, ni en terme de mortalité, ni en terme de prescription initiale inefficace. La récupération de la sensibilité était particulièrement importante dans les services de soins intensifs. L'origine de la récupération de la sensibilité pour des molécules de prescription non contrôlée est inconnue. La réduction de l'utilisation de la ceftazidime est proposée comme étant un facteur déterminant pour la diminution de la résistance constatée aux  $\beta$ -lactamines. Des résultats semblables ont été obtenus par d'autres auteurs [12, 13,90, 110, 134, 148].

La littérature fait aussi état de résultats opposés [78] maîtrise des prescriptions est sans effet sur le niveau de sensibilité des agents pathogènes isolés.

Il est maintenant admis qu'il existe (même si elle n'a pas été clairement définie) une relation de cause à effet entre consommation d'une molécule antibiotique et degré de résistance et que cette relation peut être inversée, les mesures de maîtrise de la prescription pouvant aboutir au retour à la sensibilité [22].

La diminution du niveau de résistance bactérienne est considérée d'ores et déjà comme un marqueur de qualité de la prescription antibiotique). On sait qu'il existe aussi, chez les bactéries, des évolutions de la sensibilité vers la résistance pour certains antibiotiques non pas à cause d'une pression de sélection antibiotique mais par mutation.

### 8. 5. 2. Stratégie thérapeutique

Elle doit tenir compte de différents facteurs :

- ✓ Ecologie du service d'accueil, en effet le profil de résistance dominant de *E.aerogenes* varie d'un service à l'autre, d'un établissement à l'autre. On tiendra compte de ces caractéristiques pour fixer le protocole de prescription antibiotique probabiliste du service. De plus, le clinicien n'aura pas la même attitude thérapeutique lors de l'isolement d'un cas isolé et durant une période épidémique.
- ✓ Facteurs inhérents au patient : les données concernant des hospitalisations récentes préalables, une antibiothérapie antérieure, une colonisation sont à prendre en compte.

Dans le sud de la France, les souches d'*E.aerogenes* actuellement isolées sont la plupart du temps multi-résistantes. Aussi le choix thérapeutique se compose d'une association

imipénème et aminosides. La gentamicine a une place de choix grâce à son excellente conservation d'activité. Son administration se fait sur trois jours en une seule dose journalière. Le traitement est systématiquement réévalué au bout de 48 heures, dès réception de l'antibiogramme.

Les souches pourvues d'une BLSE et résistantes à l'imipénème représentent le plus souvent une impasse thérapeutique. Dans notre expérience, l'utilisation du céfépime n'a pas eu l'efficacité clinique escomptée.

Dans les services de réanimation, de nombreuses équipes réalisent des prélèvements hebdomadaires systématiques (rectal, urines, pharyngé) afin de dépister le portage de bactéries multirésistantes par les patients. Ce dépistage précoce a pour but d'éviter la dissémination de ces souches et de posséder l'antibiogramme dès le diagnostic de l'infection [189].

Tous ne sont pas unanimes sur l'intérêt du traitement des patients colonisés. Les mesures d'isolement sont par contre largement généralisées. La situation est très différente dans les services d'hospitalisation classiques et dans les services de long séjour. Aucun dépistage n'est réalisé, les mesures d'isolement sont illusoire. Ce sont pourtant des services où la pression de sélection antibiotique est très importante, leur population ayant bénéficié de nombreux traitements antibiotiques successifs. L'attitude prise face aux colonisations (en particulier de l'arbre urinaire) n'est pas consensuelle.

### 8. 5. 3. Politique d'Hygiène

Une politique de lutte contre la diffusion épidémique des bactéries multi-résistantes est recommandée [189, 190] depuis de nombreuses années. Elle préconise dans les services de coûts séjours à risque élevé de transmission croisée (réanimation, soins intensifs, secteurs septiques de chirurgie et de médecine) un dépistage du portage chez les patients selon des modalités fixés dans les guides "maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques" et "isolement septique" du CTIN [189, 191]. Une fois dépistés, les patients sont mis en isolement jusqu'à la négativation des résultats bactériologiques.

Cette politique a un coût important en personnel et en consommables (gants, tabliers, savon antiseptique,...). Elle demande le respect strict des procédures établies.

En pratique, nombreux sont les établissements qui appliquent seulement partiellement ces mesures. Leur efficacité est alors très discutable [22].

# **PARTIE PRATIQUE**

## MATERIEL

### 1. MATERIEL BIOLOGIQUE

#### 1. 1. Souche de référence

*Enterobacter aerogenes* ATCC (American Type Collection Culture) 13048 est la souche type de l'espèce *E.aerogenes*. Elle est sensible à tous les antibiotiques testés ; utilisée d'une part pour prouver l'efficacité et l'activité des solutions d'antibiotiques testées et d'autre part pour évaluer la précision, l'exactitude et la dispersion des résultats [187].

#### 1. 2. Souches cliniques

Six souches cliniques responsables d'infections ou de colonisation pulmonaires ont été isolées dans différents hôpitaux de Marseille (La Timone, la Conception, Sainte-Marguerite et l'Hôpital Nord), **Tableau 5** [168].

Ces différentes souches pathologiques ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- leur phénotype de résistance élevée aux antibiotiques
- la caractérisation de leur profil protéique de membrane externe par immunodétection en SDS-PAGE à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre les porines.

**Tableau 5** : Caractéristiques des différentes souches bactériennes testées [168, 187].

Souches	Origine de prélèvement	Caractérisation des porines	Recherche d'un mécanisme d'efflux	Phénotype MDR
ATCC 13048	C. E	Présence	absence	-
Ea 3	L.B.P.	Présence	Présence	+
Ea 5	L.B.P.	absence	Efflux + Cm Efflux - Nor	+
Ea 19	L.B.P.	Présence	ND	ND
Ea 27	L.B.P.	absence	Présence	+
Ea I320	L.B.P.	absence	Présence	+
Ea C50249	L.B.P.	Présence	ND	+

Ea 3 : *Enterobacter aerogenes* 3.

Ea 5: *Enterobacter aerogenes* 5.

Ea 19: *Enterobacter aerogenes* 19

Ea 27: *Enterobacter aerogenes* 27

Ea I 320 : *Enterobacter aerogenes* I320

C50249 : *Enterobacter aerogenes* C50249

C : crachat, E : expectoration

L.B.P. : Liquide broncho- pulmonaire

Cm : Chloramphénicol

Nor : Norfloxacin

ND : Non déterminé

MDR : Multi Drug Resistance (multiresistance aux antibiotiques)

- : absence de phénotype MDR

+ : présence de phénotype MDR

## 2. MATERIEL UTILISE AU LABORATOIRE

### 2. 1. Outils biologiques

Les souches bactériennes utilisées pour la transformation ainsi que les différents plasmides utilisés en tant que vecteur de clonage et vecteur de surexpression, seront cités au fur et à mesure au sein de chaque technique appropriée.

### 2. 2. Appareillage

- Four Pasteur
- Four à micro onde
- Microscope optique
- Réfrigérateur ( + 4°C )
- Congélateur (- 20°C et - 80°C)
- Machine à glace
- Spectrophotomètre
- Vortex
- Micro- centrifugeuse
- Centrifugeuse
- Speed-Vac (centrifugeuse à vide)
- Echelle Mac Farland
- Thermocycleur
- Hotte bactériologique
- Cuve d'électrophorèse
- Système de vidéo documentation pour électrophorèse
- Générateur de tension
- Agitateur magnétique
- Balance électronique
- Etuves (avec et sans agitateur) réglées à 37°C
- Bain-marie (avec et sans agitateur)

### 2. 3. Milieux de culture et réactifs utilisés

- La composition des milieux de culture utilisés est mentionnée dans les annexes.
- Les réactifs utilisés sont mentionnés au sein de chaque technique appropriée.

### 2. 4. Autre matériel

- Coffret API 20 E
- Boîtes de petri en plastique
- Micropipettes 0,5 – 10  $\mu$ l
- Micropipettes 5 – 40  $\mu$ l
- Micropipettes 40 – 200  $\mu$ l
- Micropipettes 100 – 1000  $\mu$ l
- Cônes pour micropipettes
- Pipettes Pasteur
- Tubes eppendorf 1,5 ml
- Microtubes eppendorf pour PCR 0,5 ml
- Tubes Flocon 10 ml
- Tubes Flocon 50 ml
- Papier buvard
- Pincettes
- Portoirs
- Anse de platine
- Bec Bunsen
- Espaceurs
- Peignes

## METHODES

### 1. VERIFICATION DE LA PURETE DES SOUCHES

La vérification de la pureté des souches testées a été faite par isolement à partir du milieu de conservation, sur milieu Luria Bertani (LB) coulé sur boîte de pétri.

### 2. ETUDE MICROSCOPIQUE

Un examen à l'état frais et une coloration de Gram ont été réalisés pour les souches isolées sur le milieu LB pour s'assurer que les souches collectées sont purifiées.

### 3. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

L'identification biochimique des souches pures a été effectuée en utilisant le système miniaturisé API 20E. Ce système d'identification biochimique réduit considérablement l'utilisation des milieux, des réactifs et des cultures, en donnant une bonne identification pour les entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif fastidieux.

#### 3. 1. Principe

Ce système miniaturisé comporte 20 microtubes de substrats déshydratés, la suspension bactérienne répartie dans les microtubes dissout les substrats. Après incubation, les réactions sont mises en évidence par les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs [201].

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du **tableau 2** et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification et du catalogue analytique.

#### 3. 2. Mode opératoire

- ✓ Préparer la galerie en versant 5 ml d'eau dans les alvéoles du fond de la boîte d'incubation ;
- ✓ Déposer la galerie dans la boîte d'incubation ;
- ✓ Réaliser une suspension bactérienne dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau distillée stérile, avec une colonie bien isolée prise sur milieu LB solide à l'aide d'une anse de platine stérile ;
- ✓ remplir les tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL, avec la suspension bactérienne, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

- ✓ Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests ;
- ✓ créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ;
- ✓ refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures ;

**Tableau 6** : Tableau de lecture de la galerie API 20 E [201].

Tests	Substrats	Réaction enzymatique	Résultats	
			Négatif	positif
ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactoside	β-galactosidase	Incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine –décarboxylase	Jaune	orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pâle/ Jaune	bleu-vert/ bleu
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d' H <sub>2</sub> S	Incolore/ grisâtre	dépôt noir/ fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat	
			Jaune	marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	James/immédiat ou James incolore Vert pâle jaune IND jaune	IND/2min James rose IND anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+VP2/10min	
			Incolore	rose/rouge
GEL	Gélatinase de Khon	Gélatinase	Non diffusion	diffusion du pigment noir
Glu	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	jaune
RHA	Rhaminose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu -vert	jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu vert	jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu vert	jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu vert	jaune
NO <sub>3</sub> - NO <sub>2</sub>	Tube Glu	Production de NO <sub>2</sub> Réduction au stade N <sub>2</sub>	Jaune  Rouge	NIT1+NIT2/2-3min  rouge  jaune
				ZN

### 3. 3. Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie est faite en se référant au **Tableau 6** [201].

## 4. TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

La sensibilité aux antibiotiques des différentes souches d'*Enterobacter aerogenes* isolées ainsi que celle de la souche de référence ATCC 13048 a été établie par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu Mueller Hinton liquide [103].

### 4. 1. Les antibiotiques testés

Les antibiotiques testés ont été sélectionnés selon les prescriptions habituelles dans le traitement des infections à *Enterobacter aerogenes*. Ces antibiotiques se présentent sous forme de poudre lyophilisée ; imipénème (IMP), céfépime (FEP), ceftazidime (CAZ), norfloxacine (NOR) et tétracycline (TC).

### 4. 2. Technique

#### 4. 2. 1. Préparation des suspensions bactériennes

Deux à trois colonies distinctes et similaires sont prises à la surface du milieu LB gélosé, ensuite suspendues dans de l'eau stérile et le mélange sera ajusté et comparé visuellement au standard 0,5 Mac Farland qui correspond à 2-3. 10<sup>8</sup> bactéries/ ml.

#### 4. 2. 2. Préparation des différentes concentrations d'antibiotiques

Les différents antibiotiques à tester sont dilués dans de l'eau physiologique stérile. A partir de la solution d'antibiotique mère, préparer une gamme de progression arithmétique en raison de 2 dans de l'eau distillée stérile.

#### 4. 2. 3. Ensemencement

La concentration finale est obtenue après addition dans les tubes à hémolyse de 1 ml de chaque dilution de la solution antibiotique à étudier à 1 ml de la souche diluée en milieu Mueller Hinton liquide, à l'exception du tube témoin (sans antibiotique). Après agitation soigneuse, mettre à l'étuve à 37°C pendant 18 heures.

#### 4. 2. 4. Lecture

Après incubation, la CMI est la plus faible concentration en antibiotique empêchant toute croissance visible à l'œil nu de la bactérie [184, 186].

## 5. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

### 5. 1. Principe

Il s'agit d'obtenir de l'ADN nucléaire à l'état pur et concentré. Après éclatement des cellules bactériennes, l'ADN nucléaire est libéré à la suite d'un traitement par un mélange de détergent (SDS) et de protéinase K. L'ADN subit ensuite une série d'extractions (phénol, chloroforme), puis est précipité par l'alcool éthylique absolu à haute force ionique. Il précipite sous forme de filaments visibles à l'œil nu [17].

### 5. 2. Extraction à l'héxadécyltriméthyl ammonium bromure (CTAB) [22, 168]

#### 5. 2. 1. Réactif utilisés

- TE (Tris-EDTA), pH 8 : [10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)]
- SDS 20%
- Protéinase K
- Solution CTAB/ NaCl (10% CTAB dans 0,7 M NaCl)
- NaCl 5 M
- Chloroforme
- Alcool isoamylique
- Phénol
- isopropanol
- éthanol 100% et 70%
- H<sub>2</sub>O stérile

#### 5. 2. 2. Technique

- A partir d'une culture de 24 h de la souche de référence d'*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, ensemercer 3 ml de milieu LB liquide. Incuber sous agitation au bain-marie à 37°C pendant la nuit.

- Lyse des bactéries :
  - ↳ Répartir les 3 ml de la culture bactérienne dans 2 tubes eppendorf.
  - ↳ Equilibrer et centrifuger 10 min à 4°C à 4000 rpm.
  - ↳ Resuspendre le culot bactérien dans un 1ml de TE, 100 µl SDS 20% et 15 µl de Protéinase K (5 mg/ ml).
  - ↳ Mélanger doucement et incubé à 37°C pendant 1 heure.
  - ↳ Ajouter 400 µl d'une solution CTAB/ NaCl préalablement chauffée à 65°C, mélanger et incubé à 37°C pendant 10 min.
- Extraction proprement dite :
  - ↳ Ajouter un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique sous la hotte, mélanger doucement et centrifuger à température ambiante pendant 20 min à 5000 rpm pour éliminer les complexe CTAB-protéine /LPS.
  - ↳ Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes eppendorf et ajouter un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique.
  - ↳ Centrifuger 20 min à température ambiante à 2000 rpm.
- Précipitation :
  - ↳ Transférer la phase aqueuse qui contient les acides nucléiques dans de nouveaux tubes eppendorf.
  - ↳ Ajouter 0,8 volume d'isopropanol ou 2 volumes d'éthanol absolu.
  - ↳ Mélanger doucement puis centrifuger à 4°C pendant 20 min à 8000 rpm.
  - ↳ Laver le culot dans l'éthanol 70% à température ambiante.
  - ↳ Enlever tout le liquide et sécher au Speed Vac.
- Elution :
  - ↳ Resuspendre le culot dans 50 µl TE (tampon à faible force ionique).
- Vérification de l'extraction d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%

### 5. 3. Extraction par kit QIA quick QIAgen

Le kit QIA quick QIAgen, permet une extraction d'ADN génomique rapide et pure. Le protocole est illustré sur la **figure 13** [196].

#### 5. 3. 1. Réactifs utilisés

- Tampon ATL.
- Protéinase K.
- Tampon AL.
- Ethanol absolu.
- Tampon AW1.
- Tampon AW2.
- Tampon d'éluion AE.
- Colonne QIA amp Spin column

#### 5. 3. 2. Technique

- Lyse des bactéries :

- ↳ Répartir les 3 ml de la culture bactérienne dans 2 tubes eppendorf.
- ↳ Centrifuger pendant 10 min à 5000 xg (7500 rpm)
- ↳ Resuspendre le culot bactérien dans 180 µl de tampon ATL.
- ↳ Ajouter 20 µl de protéinase K : mixer en vortexant et incubé à 55°C au bain-marie.
- ↳ jusqu'à lyse complète (1 à 3 heures).
- ↳ Ajouter 200 µl de tampon AL, mixer en vortexant puis incubé à 70°C pendant 10min.

- Extraction proprement dite :

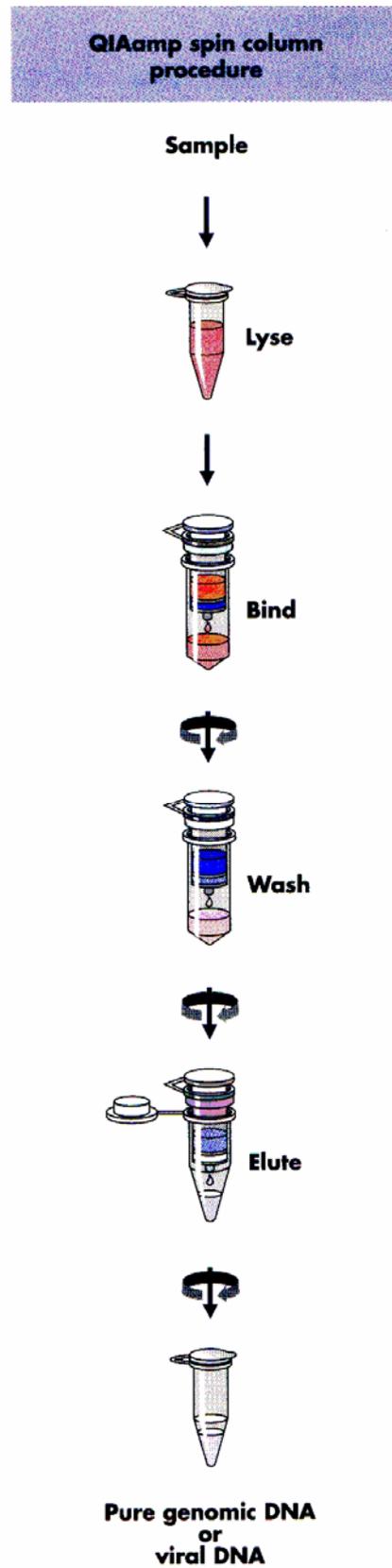
- ↳ Ajouter 210 µl d'éthanol absolu, vortexer pour bien homogénéiser la solution. Un précipité blanc se forme à l'addition de l'éthanol.
- ↳ Placer QIA amp Spin column dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat.

- Lavage au tampon AW :

- ↳ Ajouter 500 µl du tampon AW1 au QIA amp Spin columnin.
- Centrifuger à 6000 xg
- ↳ ( 8000 rpm ) pendant 1min.
- ↳ Placer les colonnes dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube contenant le filtrat.
- ↳ Ajouter aux colonnes 500 µl de tampon AW2.
- ↳ Centrifuger pendant 3 min à grande vitesse.
- ↳ Placer les colonnes dans de nouveaux tubes.

- Elution :

- ↳ Dans la colonne, éluer l'ADN deux fois avec 200 µl du tampon AE ou de l'eau distillée
- ↳ Préchauffé(e) à 70°C. Incuber à température ambiante pendant 1min puis centrifuger à 6000 xg (8000 rpm) pendant 1min.
- ↳ Vérifier l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.



**Figure 13** : Protocole d'extraction par kit QIA Quick de Qiagen [196].

## 5. 4. Migration électrophorétique

L'emploi de l'électrophorèse est quotidien, les molécules d'ADN (chargées négativement) migrent dans un champ électrophorétique vers l'anode. En passant à travers les mailles de l'agarose, les molécules se séparent selon leur taille : les molécules les plus grandes sont d'avantage retenues que les molécules plus petites et migrent moins vite et donc moins loin dans le gel. L'acrylamide a un pouvoir séparateur plus important que l'agarose. Cependant la réalisation des gels d'acrylamide est moins aisée et ce produit est toxique [171].

### 5. 4. 1. Réactifs utilisés

- Tris-Borate EDTA (TBE) 1X :

Tris base	45 mM
Acide borique	45 mM
EDTA 0,5 M (pH 8)	1,25 mM
- Solution de bromure d'éthidium ( B.E.T), 10 mg/ml.

Bromure d'éthidium	1 g
H <sub>2</sub> O distillée stérile	q.s.p. 100 ml

### 5. 4. 2. Préparation du gel

- Dissoudre l'agarose à raison de 1% (0,50 g dans 50 ml de tampon TBE 1X concentré)
- Chauffer le mélange pour faire dissoudre la solution d'agarose au four à micro- onde jusqu'à ébullition.
- Après refroidissement, couler le gel dans un moule où le peigne est déjà mis en place.
- Laisser refroidir jusqu'à la prise en masse du gel, puis retirer le peigne.
- Le gel est ensuite mis dans la cuve qui contient le tampon TBE 1X de façon à ce que le gel soit totalement immergé dans le tampon.

### 5. 4. 3. Préparation des échantillons à analyser

Mélanger 4  $\mu\text{l}$  de la solution d'ADN à analyser avec 3  $\mu\text{l}$  de tampon de charge qui contient du bleu de bromophénol comme témoin de migration et du sucrose qui permet d'alourdir l'échantillon pour qu'il tombe bien dans le puits au moment du dépôt.

### 5. 4. 4. Le dépôt

- Chaque échantillon ainsi préparé (7  $\mu\text{l}$ ) est introduit à l'aide d'une micropipette dans le puits.
- Déposer aussi dans un des puits 7  $\mu\text{l}$  d'un marqueur de taille (ex: Smart Leader, marqueur II, marqueur V de Boehringer).
  - ↳ Smart Leader : ADN issu de la PCR étudiée pour qu'il y ait des tailles faciles à reconnaître (100, 200, 300,..... 8000pb).
  - ↳ Marqueur II : ADN du phage  $\lambda$  coupé par Hind III.
  - ↳ Marqueur V : ADN du plasmide pBR322 coupé par Hae III.

### 5. 4. 5. Migration

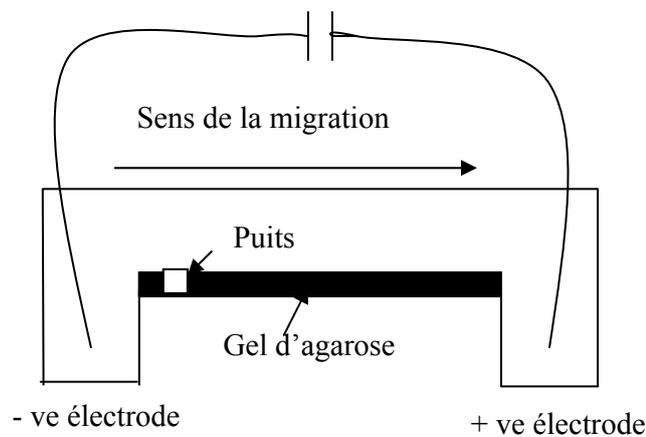
Le générateur est réglé à 100V et la migration de l'ADN se fait de la cathode vers l'anode sous l'influence d'un champ électrique **Figure 14**.

### 5. 4. 6. Coloration au B.E.T

- Après migration, le gel est déposé dans un bac contenant du bromure d'éthidium ; de sorte qu'il soit bien immergé.
- Laisser colorer pendant 20 à 30 min puis décolorer par lavage avec de l'eau stérile.
- Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et a la propriété de fluorescer en rouge orange lorsqu'il est sous lumière ultraviolette.

### 5. 4. 7. Visualisation sous ultra- violets

Le gel d'agarose est déposé sur la plaque de l'appareil Image Master VDS de Pharmacia Biotech où il peut être analysé directement par observation des bandes fluorescentes de l'ADN sous une lampe à UV, une photo du gel est prise.



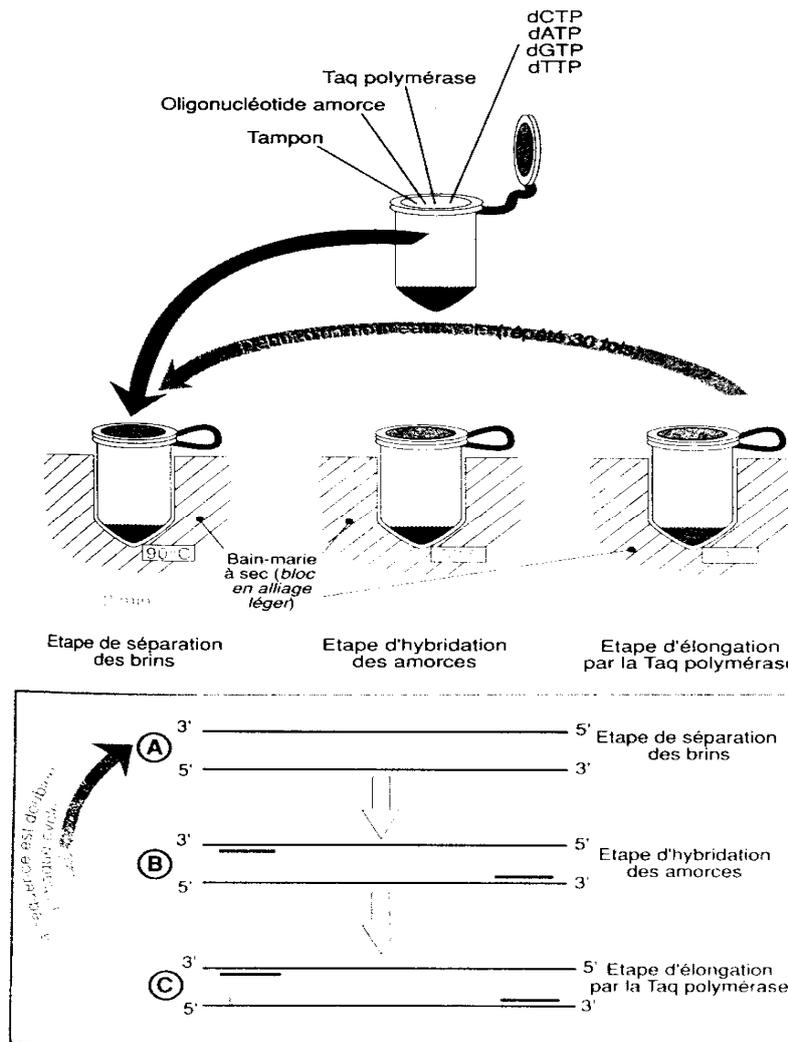
**Figure 14** : Dispositif du gel d'agarose

## 6. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La méthode d'amplification de séquence nucléique par Polymerase Chain Reaction (PCR), chef de file des méthodes d'amplification géniques, a été décrite par K. Mullis en 1983 et publiée en 1985 et lui a valu le prix Nobel de Chimie en 1993 [97]. Par la suite, cette technique est devenue un outil quasiment universel dans le domaine de la biologie.

### 6. 1. Principe

La technique d'amplification (PCR) est une révolution, elle permet d'obtenir des dizaines, voire des centaines de nanogrammes d'une séquence dont on ne dispose qu'à l'état de traces. Elle consiste à effectuer de multiples réplifications *in vitro* de l'ADN, en utilisant comme amorces des oligonucléotides s'hybridant avec les extrémités 3' de la portion de séquence à amplifier. Le nombre de copie croît de manière exceptionnelle avec le nombre de réplifications effectuées, **Figure 15** [17, 92, 97, 160, 166, 171].



**Figure 15** : La technique d'amplification (PCR) :

L'ADN contenant la séquence à amplifier [97].

A est chauffé à 94°C afin de séparer les deux brins, qui après refroidissement à 50°C (cette température est en fait fonction de la séquence des amorces utilisées) s'hybrident avec les amorces B constituées d'oligonucléotides de 20 à 25 bases s'hybridant parfaitement avec les extrémités 3' de la portion de séquence à amplifier : la Taq polymérase (ADN polymérase thermostable) synthétise le brin complémentaire à partir de ces amorces C. Le nombre de copies de la séquence a été doublé en quelques minutes. Le même cycle est répété autant de fois que nécessaire. Dans la pratique le nombre de cycle est d'environ 35.

## 6. 2. Application de la technique d'amplification (PCR) sur l'ADN de la souche de référence ATCC 13048

### 6. 2. 1. Outils biologiques

Le milieu réactionnel tamponné comprend tous les éléments indispensables :

- ↳ L'ADN à étudier servant de matrice.
- ↳ L'ADN polymérase capable de synthétiser le brin complémentaire au brin matrice.
- ↳ Les amorces ; qui sont de courtes séquences d'ADN (oligonucléotides synthétiques d'une longueur de 17 à 30 bases) de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier serviront d'amorces (ou primer) pour l'enzyme de réplication. Leur association en amont et en aval de la région cible est suivie de son élongation par la polymérase, l'extension d'amorce s'effectue en même temps sur les deux brins d'ADN.
- ↳ Les précurseurs trinucleotidiques (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) qui seront intégrés dans le brin néosynthétisé.
- ↳ Le cation  $Mg^{+2}$  indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs.

### 6. 2. 2. Technique

La technique d'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) est utilisée pour l'identification du gène de la porine 35 chez *Enterobacter aerogenes*, analogue au gène de la porine OmpK 35 de *Klebsiella pneumoniae* ( espèce taxonomiquement proche d'*E.aerogenes*)

Dans ce but, l'ADN extrait de la souche de référence d'*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 est amplifié par PCR en utilisant le couple d'amorces B/2 choisies selon le programme « Primers ! » <http://www.williams stone.com> sur le gène analogue *ompK* 35 de *K.pneumoniae*.

**B** : 5'- GAC-TAG-GGT-GGT-AAC-TAC-GGC-3'

**2** : 5'- TTG-TTG-AAG-TAG-TAG-GT-3'

L'amplification est réalisée sur l'appareil thermocycleur Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400.

Le mélange de PCR est constitué de :

- ✓ 12,5 p mol de chaque amorce sens et anti-sens
- ✓ tampon 10X (Gibco, Gaithersburg, Md)
- ✓ MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM.
- ✓ 200 μmol d NTP.
- ✓ 1 unité de Taq ADN polymérase (5 unités/ μl, Gibco).
- ✓ 10 μg/ml d'ADN génomique ATCC 13048.
- ✓ H<sub>2</sub>O stérile q.s.p.50 μl.

Le programme d'amplification est comme suit :

	35 cycles				
94°C	94°C	48°C	72°C	72°C	72°C
5min	1min	1min	1min	7min	7min

Les produits de PCR sont ensuite contrôlés sur gel d'agarose 1% sous rayons ultraviolets, après coloration au BET, puis purifiés et séquencés.

### 6. 3. Purification et séquençage

Les produits de PCR sont purifiés par filtration sur colonnes Microcon PCR à l'aide du kit « Amicon Microcon PCR Purification System » [194] comme suit :

- Dans une colonne Microcon PCR, mettre le produit de PCR (environ 45 μl).
- Compléter avec de l'eau stérile jusqu'à 500 μl.
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 15 min.
- Garder la colonne et changer le tube puis ajouter 20 μl d'eau stérile.
- Contrôler la purification du produit de PCR sur gel d'agarose.

Les produits de PCR ainsi purifiés sont ensuite séquencés avec les mêmes amorces qui ont servi à l'amplification (B et 2) selon le principe du « Dye Terminator » (nucléotides fluorescents), **Figure 16** [160, 166, 171].

La réaction est réalisée dans deux tubes séparés pour chaque amorce (B, 2). Dans chaque tube est ajouté les ddNTP marqués chacun avec un fluorophore spécifique, l'ADN polymérase thermostable et la polymérisation se fait dans une machine de type PCR avec des cycles comprenant trois étapes : dénaturation, appariement et élongation.

Les fragments d'ADN sont séparés sur gel par un système laser permettant d'identifier la nature du fluorophore. Les résultats sont transférés sur ordinateur et un programme informatique permet d'avoir accès au chromatogramme correspondant à la séquence.

Dans cette technique, les réactions de séquence ont été réalisées à l'aide du kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer, Foster City, Californie). Ce mélange prêt à l'emploi contient des didéoxynucléotides fluorescents et désoxyanucléotides, tampon et une ADN polymérase. Huit microlitres du mix (Taq polymérase, dNTP, tampon, MgCl<sub>2</sub>) dRhodamine Terminator fourni par le fabricant(Perkin Elmer), 2 µl d'amorce à 3,2 pmol/ µl, 50 à 100 mg d'ADN à séquencer et de l'eau distillée stérile ; quantité suffisante pour 20 µl. Puis 25 cycles de 10 secondes, 5 secondes à 50°C et 4 min à 72°C.

En fin de cycle, reprendre les 20 µl par 50 µl d'éthanol 96° et par 2 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8).

Mettre le tube 15 min dans la glace, puis centrifuge 15 min à 12000 rpm.

Aspirer le surnageant, puis on lave le culot par 250 µl d'éthanol 70°.

Centrifuger 3 min à 12000 rpm.

Éliminer le surnageant et sécher le culot.

Séquencer l'ADN par électrophorèse capillaire avec le séquenceur Perkin Elmer Abi Prism 310 Gene Analyser.



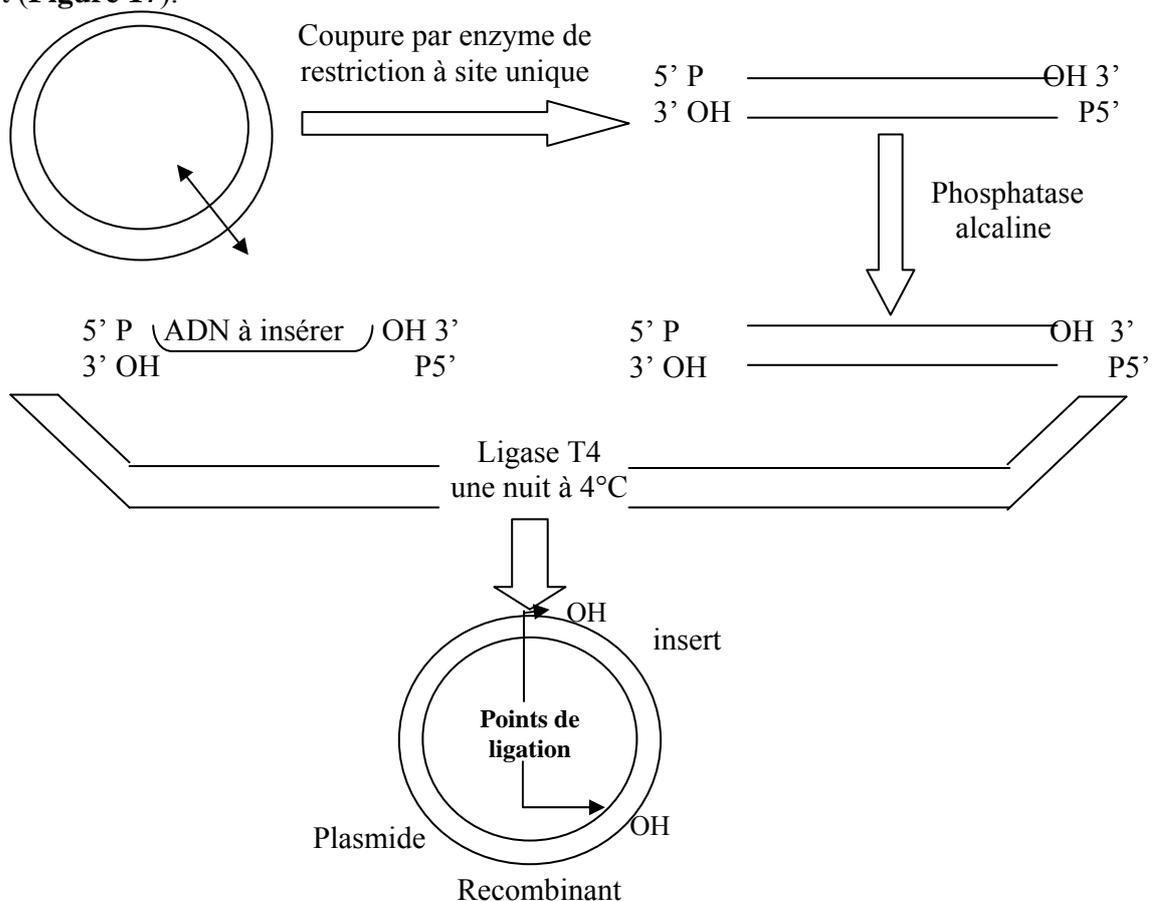
## 7. CLONAGE DU GENE PARTIEL DE PORINE ANALOGUE A OmpK

### 7. 1. Principe

Le but du clonage est d'obtenir un grand nombre de copies absolument pures d'une séquence donnée d'ADN. Ce processus s'effectue par sélection d'un clone bactérien recombinant contenant le vecteur dans lequel l'ADN que l'on désire obtenir est intégré.

Le vecteur de clonage est coupé par une enzyme de restriction qui connaît un site unique (généralement placé au niveau du site de polyclonage), ce site étant unique, le vecteur est donc linéarisé et possède à chaque extrémité une partie de la séquence d'ADN reconnue par l'enzyme de restriction. L'ADN exogène du micro-organisme donneur est digéré par la même enzyme de restriction que celle utilisée pour la linéarisation du vecteur. Lorsque le plasmide linéarisé et les fragments de l'ADN donneur sont confrontés, il y aura hybridation des extrémités cohésives complémentaires suivant les lois de complémentarité des bases [160, 166, 171, 175].

Une enzyme permettant la formation d'une liaison covalente entre ces fragments d'ADN hybridés est alors ajoutée (une ligase) qui va ligaturer les fragments d'ADN étrangers au plasmide. Le plasmide obtenu de nouveau circulaire est dit recombinant s'il a intégré un insert (**Figure 17**).



**Figure 17:** Construction d'un plasmide recombinant [166]

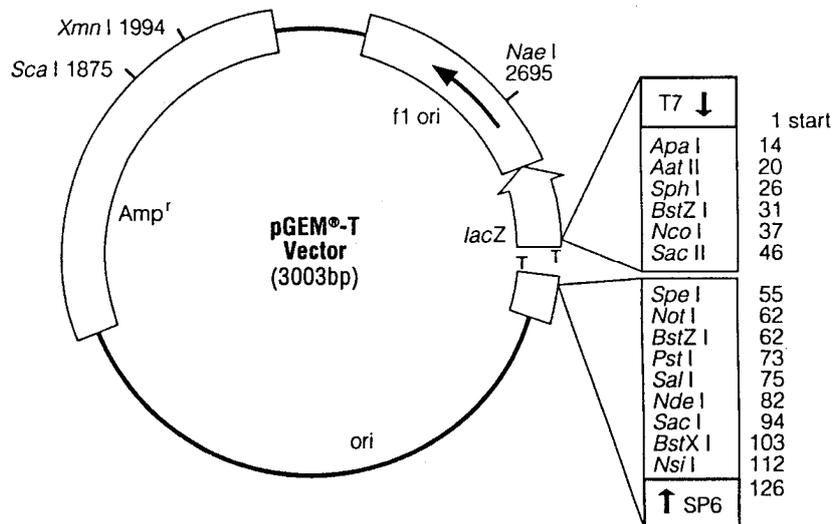
## 7. 2. Réactifs utilisés

Le kit « pGEM<sup>®</sup>-T Vector System » contenant :

- 1,2 µl pGEM<sup>®</sup>-T Vector (50 ng/µl).
- 100 unités T4 DNA ligase.
- 200 µl 2 X Rapid Buffer, T4 DNA ligase
- 12 µl Contrôl Insert DNA (4 ng/µl)

## 7. 3. Technique de clonage en utilisant le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T

Le système pGEM-T Vector System est utilisé pour le clonage des produits de PCR. Le vecteur est préparé par digestion par une enzyme de restriction 5Zf (+) (Promega) puis additionné de thymidine au 3' terminal des deux bouts (**Figure 18**) [198].



**Figure 18** : la carte du vecteur pGEM-T [198]

Les produits d'amplification de la PCR réalisée à l'aide des amorces B et 2, sont insérés dans le vecteur de clonage ; le plasmide pGEM-T (50 ng), Promega, qui contient les promoteurs T7 et SP6 RNA polymérase issus des phages T7 et SP6, un site à clonage multiple (MCS), le gène lacZ qui code l'enzyme β-galactosidase ce qui permet le dépistage bleu-blanc et enfin le gène qui code pour la résistance à l'ampicilline.

La ligation est réalisée dans des microtubes stériles selon le protocole suivant :

- Centrifuger le vecteur pGEM–T et le contrôle insert DNA, pour bien homogénéiser et collecter le contenu au fond des tubes ;
- Vortexer le tampon de ligation rapide 2X (2X Rapid Ligation Buffer)

	Réaction standard	Contrôle positif
tampon 2X.....	5 µl	5 µl
pGEM–T (50 ng).....	1 µl	1 µl
produit de PCR.....	3 µl	----
contrôle ( contrôle insert DNA)....	----	2 µl
T4 DNA ligase.....	1 µl	1 µl
	10 µl	10 µl

- Bien mélanger à l'aide d'une micropipette, incubé pendant 1 heure à température ambiante (pour avoir un bon rendement, incubé toute la nuit à 4°C).
- Après incubation, le mix de clonage sera transformé dans JM109 compétentes.

## 7. 4. Incorporation du plasmide recombinant à l'hôte

### 7. 4. 1. Principe

Le principe est d'intégrer dans une cellule bactérienne (rendue après traitement susceptible d'incorporer l'ADN exogène, généralement *Escherichia coli*, les vecteurs recombinants, c'est à dire contenant un insert d'ADN exogène, obtenu après clonage. Lorsqu'un vecteur recombinant est intégré par transformation génétique dans une nouvelle cellule, il est capable de s'y répliquer de façon autonome. Ce faisant, il réplique également le fragment d'ADN qu'il contient au site de polyclonage (MCS), ce qui permet d'amplifier ce fragment et de le purifier en grande quantité [171].

### 7. 4. 2. Réactifs utilisés

- CaCl<sub>2</sub> 0,1 M.
- Milieu LB liquide et solide.
- *Escherichia coli* JM109 (res<sup>-</sup>, rec A<sup>-</sup> et lac<sup>-</sup>).
- Ampicilline 50 µg/ ml.
- IPTG (Isopropyl - β-D - Thiogalactopyranoside) 32 µg/ml.
- X-Gal (5-bromo- 4 - chloro-3- indolyl- β- galactopyranoside) 200 µg/ml.

### 7. 4. 3. Choix de l'hôte

Le choix de l'hôte dépend principalement du vecteur utilisé, le plus souvent possible, c'est des hôtes bactériens qui sont utilisés, car ils se multiplient rapidement (temps de génération : 20 à 30 min), sont faciles à manier et peu onéreux. Les bactéries utilisées sont non pathogènes et affaiblies afin de diminuer les risques de dissémination accidentelle. Le choix se porte presque constamment sur des souches d'*E.coli* res<sup>-</sup>, c'est à dire restriction négative afin que l'ADN inséré ne soit pas détruit par les enzymes bactériennes. Les souches sont aussi souvent choisies recA<sup>-</sup> de manière à éviter tout phénomène de recombinaison au sein de l'ADN inséré ou entre l'ADN inséré et l'ADN bactérien. Enfin certaines expériences nécessitent des souches lac<sup>-</sup> comme JM109, lesquelles doivent être conservées sur un milieu minimum afin de diminuer l'apparition de révertants lac<sup>+</sup>.

### 7. 4. 4. Préparation des cellules compétentes

Afin de faciliter la pénétration des molécules d'ADN à travers la paroi et la membrane plasmique, les bactéries JM 109 en phase exponentielle de croissance sont fragilisées par un traitement au chlore de calcium à 4°C.

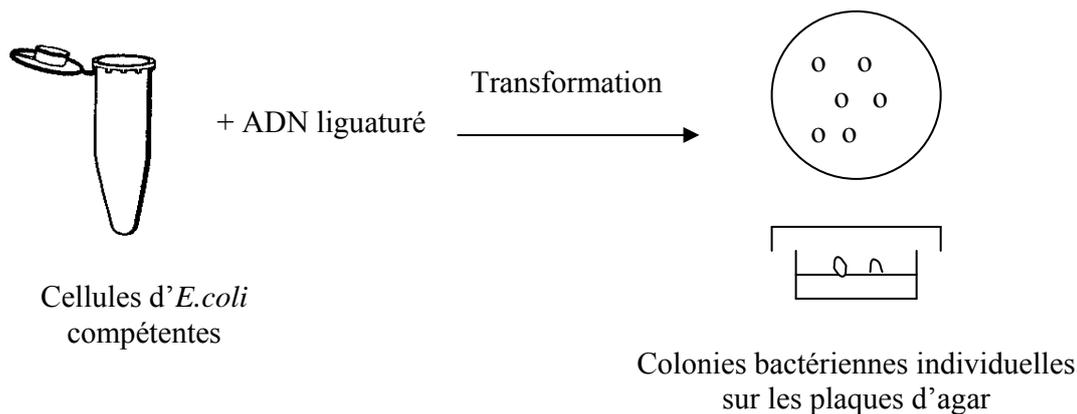
- Faire une préculture de la souche *E.coli* JM 109 dans 3 ml de milieu LB, pendant 18 heures à 37°C sous agitation.
- ensemencer 50 ml de milieu LB dans un erlène avec 500 µl de la préculture, incubé 2 h 30 min à 37°C sous agitation.
- Centrifugation 10 min à 4°C à 4000 rpm.
- Reprendre le culot dans 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M froid.
- Laisser la suspension dans la glace pendant 10 à 15 min .
- Centrifuger 10 min à 4°C à 4000 rpm.
- Reprendre le culot dans 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M froid.
- Conserver à (- 80°C) jusqu'à utilisation .

### 7. 4. 5. Protocole de la transformation

- Dans un tube eppendorf stérile et préalablement refroidi à 4°C, mélanger 200 µl de cellules compétentes avec 2 µl d'ADN ligué
- Incuber 30 min dans un bain-marie glacé.
- Faire sortir le tube et le mettre dans un bain-marie à 42°C pendant 1 min 30, ensuite pendant 10 min dans un bain-marie glacé.
- Ajouter stérilement 500 µl de milieu LB, bien mélanger.

- Incuber pendant 1 heure 30 à 37°C sous agitation à l'étuve.
- Etaler à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, et à proximité du bec Bensen 200 µg/ml du mélange de transformation sur milieu LB additionné de 50 µg/ml d'ampicilline, 32 µg/ml d'X-Gal et de 200 µg/ml d'IPTG.

Après incubation à l'étuve à 37°C pendant 18 heures, des colonies bactériennes individuelles apparaissent sur les plaques d'agar (**Figure 19**).



**Figure 19** : La formation de colonies individuelles après la transformation d'*E.coli*.

#### 7. 4. 6. Choix de clones : (dépistage bleu-blanc)

La procédure la plus sophistiquée qui vise à dépister la présence de plasmide recombinants est le dépistage bleu-blanc après culture des bactéries sur un milieu sélectif contenant l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par le plasmide.

L'inactivation insertionnelle du gène *lacZ* sur le plasmide peut être utilisée pour dépister les recombinants sur une plaque contenant l'IPTG et le X-Gal. Le X-Gal est converti en produit bleu si le gène *lacZ* est intact et provoqué par l'IPTG, ainsi les recombinants croissent comme des colonies blanches.

Disposant d'un certain nombre d'ADN recombinant dans *E.coli* JM109, il est nécessaire d'analyser une partie de ces plasmides afin de sélectionner celui ou ceux, contenant le fragment d'ADN inséré.

Dans ce but, extraire les plasmides (8.1) qui seront coupés avec les même enzymes de restriction. Après migration sur gel d'agarose à 1%, le bon plasmide est sélectionné par la présence d'un marqueur de poids moléculaire.

## 7. 5. Amplification des produits clonés

Afin d'isoler les fragments du gène spécifique de la porine analogue à ompK 35 obtenus à l'aide des amorces B et 2, les produits de PCR sont insérés dans le plasmide pGEM-T. Une amplification par PCR est réalisée avec les amorces du plasmide M13D et M13R.

- **M13D** : 5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG- 3'
- **M13R** : 5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT G- 3'

Le mélange de PCR est constitué de :

- 1  $\mu$ l ADN génomique
- 5  $\mu$ l tampon 10X
- 2  $\mu$ l dNTP
- 5  $\mu$ l amorce M13D
- 5  $\mu$ l amorce M13R
- 1  $\mu$ l Taq DNA polymérase
- 31  $\mu$ l H<sub>2</sub>O stérile

—————  
50  $\mu$ l

- Le programme d'amplification est :

94°C	94°C	48°C	72°C
3min	1min	1min	7min

- Vérifier l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% .

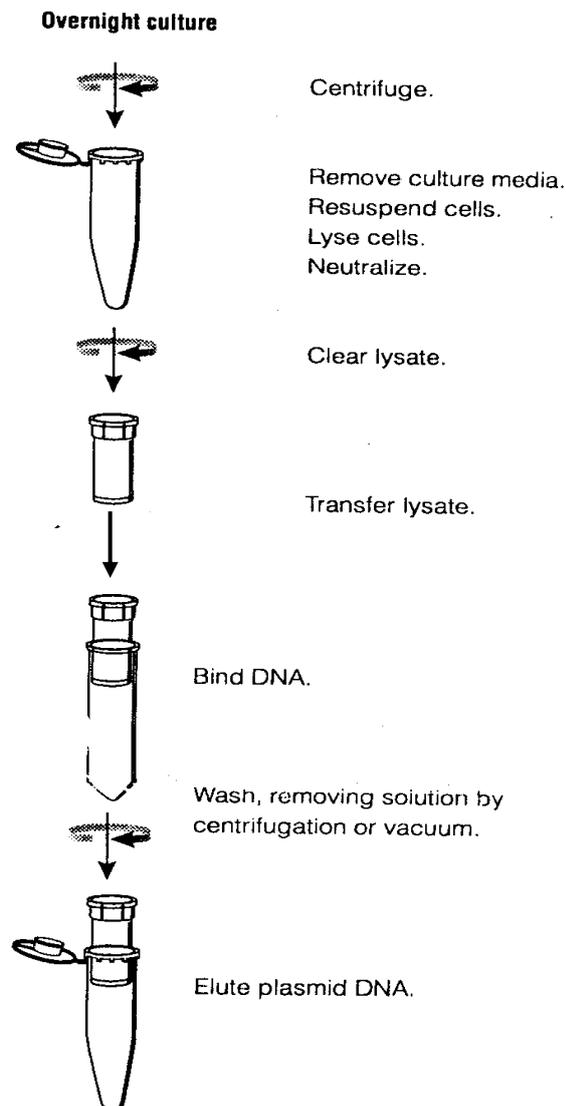
## 8. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE

### 8. 1. Principe

Lors d'un clonage, des dizaines de clones doivent être étudiés. Il ne faut pour cela que quelques microgrammes de plasmides de chaque clone recombinant dont la qualité n'a pas besoin d'être parfaite, on a alors recours à la technique « des mini- preps », elle comprend une étape de lyse alcaline au cours de laquelle les deux types d'acides nucléiques sont dénaturés. Le pH est ensuite neutralisé rapidement ce qui aboutit à une forme soluble pour les plasmides et à un agrégat insoluble pour l'ADN chromosomique ce dernier incluant également les protéines dénaturées. Après centrifugation, l'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est précipité par l'éthanol et le culot après centrifugation est repris par du TE ou de l'eau stérile [17, 171].

## 8. 2. Extraction par le kit « Wizard Plus SV Mini prep » ( Promega)

Le Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, fournit une méthode simple et fiable pour une extraction rapide de l'ADN plasmidique . La mini- prep peut être réalisée en 30 min ou moins (dépend du nombre d'échantillons). Le protocole (**Figure 20**) décrit ci-dessous est utilisé pour extraire un ADN plasmidique à partir d' *E.coli* [203].



**Figure 20** : Protocole d'extraction d'ADN plasmidique avec le kit « Wizard Plus SV Minipreps » [203].

### 8. 3. Réactifs utilisés fournis dans le kit

- Solution de resuspension ( Cell Resuspension Solution) :
  - 50 mM Tris- Hcl ( pH 7,5 )
  - 10 mM EDTA
  - 100 µg/ml RNase A
- Solution de lyse (Cell Lysis Solution) :
  - 0,2 M NaOH
  - 1% SDS
- Proéase alcaline
- Solution neutralisante :
  - 4,09 M guanidine hydrochloride.
  - 0,759 M acétate de potassium.
  - 2,12 M acide acétique glacial
  - pH final est approximativement de 4,2
- Solution de lavage (Column Wash Solution) :
  - 162,8 mM acétate de potassium.
  - 27,1 mM Tris-Hcl pH 7,5
  - Ajouter 35 ml d'éthanol 95% pour que les concentrations finales soient de : éthanol 60% , 60 mM acétate de potassium et 10 mM Tris-Hcl.
- Tampon d'élution: Nuclease Free Water.

### 8. 4. Technique

- ensemencer 3 ml de milieu LB, additionné de 3 µl d'ampicilline avec un clone recombinant (clone blanc piqué avec un cure dent stérile), incuber au bain- marie sous agitation à 37°C de 12 à 16 heures.
- Répartir les 3 ml de la culture bactérienne dans des tubes eppendorf stériles.
- Centrifuger pendant 5 min à 10 000xg.
- Jeter le surnageant, inverser les tubes sur du papier pour bien enlever les gouttelettes du surnageant.
- Resuspension des cellules :
  - Ajouter 250 µl de solution de resuspension, vortexer ou pipeter. Il est essentiel de parfaitement resuspendre les cellules.

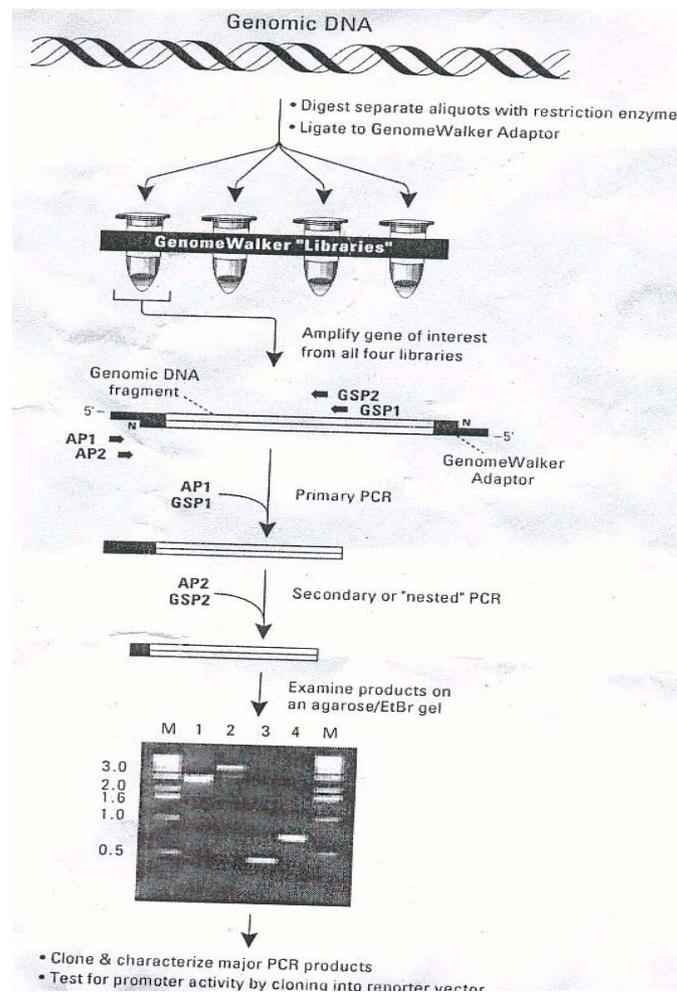
- Lyse alcaline :
    - Ajouter 250  $\mu$ l de solution de lyse, inverser les tubes 4 fois pour mixer.
    - Incuber pendant 5 min à température ambiante.
  - Neutralisation :
    - Ajouter 350  $\mu$ l de solution neutralisante et mixer immédiatement en inversant les tubes 4 fois.
    - Centrifuger pendant 10 min à 14000 xg.
    - Transférer le surnageant (850  $\mu$ l) dans les colonnes « Spin Column ».
    - Centrifuger pendant 1 min puis jeter le liquide collecté dans le tube.
  - Lavage :
    - Ajouter 750  $\mu$ l de solution de lavage diluée auparavant avec de l'éthanol 95%.
    - Centrifuger pendant 1 min.
    - Relaver le culot avec 250  $\mu$ l de solution de lavage
    - Centrifuger pendant 2 min.
  - Elution :
    - Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1,5 ml.
    - Eluer l'ADN plasmidique, en ajoutant 50  $\mu$ l de Nuclease Free Water.
    - Centrifuger pendant 1 min.
    - Transférer l'ADN plasmidique élué dans des tubes eppendorf stériles et conserver à 4°C.
- Vérifier la mini-prep sur gel d'agarose à 1%.

## 9. SEQUENÇAGE PAR PROGRESSION SUR LE GENOME (GENOME WALKER)

Afin d'identifier les séquences flanquantes du gène de la porine 35 chez *Enterobacter aerogenes* analogue à ompK 35 de *K. pneumoniae*, nous avons utilisé le kit Genome Walker (Clontech, USA) [157, 166, 201].

Les différentes étapes ont été réalisées avec l'ADN génomique de la souche de référence ATCC 13048 en suivant les instructions du fabricant (**Figure 21**).

Le Genome Walker DNA Walking est une méthode simple pour trouver la séquence d'ADN génomique inconnue adjacent à une séquence d'ADN connue telle  $DNA_C$  (Siebert et al., 1995) [157, 166, 202].



**Figure 21** : Protocole du « Genome Walker » [202].

## 9. 1. Principe

La marche génomique permet de cloner les séquences génomiques flanquantes une séquence d'ADN connue et déjà clonée. Cette technique permet aussi bien de caractériser la séquence située en amont (5'P) que la séquence située en aval (3'OH) de séquence connue. C'est une approche rapide, très sensible, spécifique et qui nécessite peu d'ADN génomique. Ce dernier est digéré par des enzymes de restriction donnant des bouts francs. Un adaptateur de séquence connue et ligué à chaque extrémité et l'ADN ainsi couplé à cet adaptateur est utilisé comme matrice dans une réaction de PCR. Les premières amorces (*en aval* 3'OH et en amont 5'P) sont spécifiques de la séquence d'ADN connue et les secondes amorces complémentaires de l'adaptateur.

Ces amorces ne pourront s'hybrider que si un brin d'ADN a préalablement été recopié à partir des premières amorces.

Au cours de la PCR nichée (nested PCR), on aura donc une amplification spécifique de la séquence comprise entre l'amorce spécifique et l'adaptateur. La longueur de cette séquence va dépendre de la position du site de restriction le plus proche.

En général, quatre à six enzymes différentes sont utilisées afin d'avoir des produits de PCR de tailles différentes [157, 166, 202].

## 9. 2. Réactifs utilisés

Le kit Universal Genome Walker contient six enzymes de restriction avec leurs tampons de restriction spécifiques.

- 30 µl Dra I (10 unités / µl)
- 100 µl tampon de restriction Dra I 10X
- 25 µl EcoR V (10 unités/ µl)
- 50 µl tampon de restriction EcoR V 10X
- 50 µl Pvu II (10 unités/ µl )
- 100 µl tampon de restriction Pvu II 10X
- 25 µl StuI (10 unités/ µl)
- 50 µl tampon de restriction Stu I 10X
- 25 µl Alu I (10 unités/ µl)

- 50 µl tampon de restriction Alu I 10X
- 30 µl Nru I (10 unités/ µl)
- 100 µl tampon de restriction Nru I 10X
- 10 µl T4 DNA ligase (6 unités/ µl)
- 40 µl tampon de ligation 10X
- 36 µl adaptateur (Genome Walker Adaptator) 25 µM.
- 250 µl amorce pour l'adaptateur ( Adaptator Primer) AP1; 10 µl.
- 250 µl amorce pour l'adaptateur ( Adaptator Primer) AP2; 10 µl.
- 250 µl amorce spécifique du gène ; A351 du côté 3'OH (10 µM).
- 250 µl amorce spécifique du gène ; A352 du côté 3'OH (10 µM).
- 250 µl amorce spécifique du gène B351 du côté 5'P (10 µM).
- 250 µl amorce spécifique du gène B352 du côté 5'P (10 µM).
- 2x1 ml tampon de réaction de PCR Tth, 10X
- 1ml Mg (OAC)<sub>2</sub> 25 mM.
- 30 µl Tth DNA polymérase ( 5 unités/ µl).
- dNTP mix : 10 mM de chaque désoxynucléotide : dATP, dGTP, dCTP, dTTP conservés à 20°C.
- H<sub>2</sub>O stérile

### 9. 3. Technique

#### 9. 3. 1. Restriction

Nous avons réalisé une digestion de l'ADN génomique d'*E.aerogenes* ATCC 13048 par six enzymes de restriction (Alu I, Dra I, EcoR V, Nru I, Pvu II et Stu I) ce qui va donner à chaque fois quatre extrêmités franches ( extrêmités blunts).

Enzyme de restriction	Site de restriction
Alu I	AG CT
Dra I	TTT AAA
EcoR V	GAT ATC
Nru I	TCG CGA
Pvu II	CAG CTG
Stu I	AGG CCT

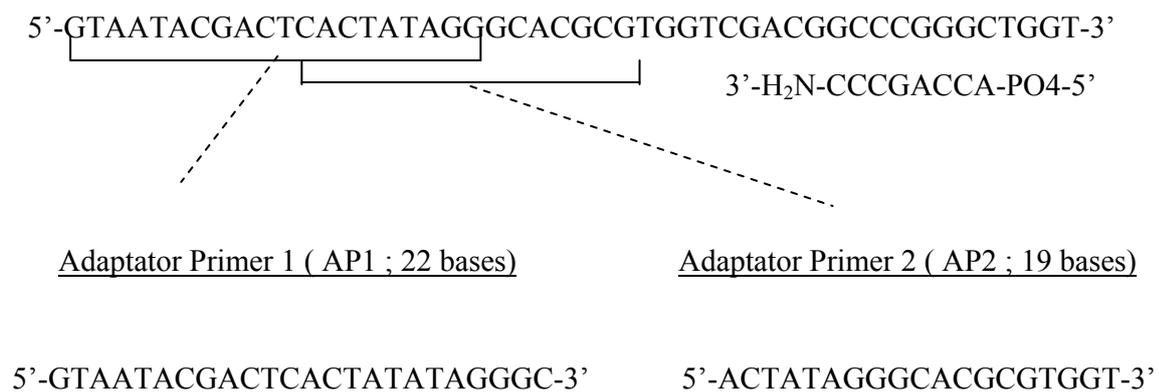
Chaque réaction digestive est réalisée dans un tube eppendorf, avec un volume final de 25  $\mu\text{l}$  :

- ADN ATCC 13048 purifié..... 6  $\mu\text{l}$
  - Tampon de restriction 10X..... 2,5  $\mu\text{l}$
  - Enzyme de restriction..... 2  $\mu\text{l}$
  - H<sub>2</sub>O stérile.....14,5  $\mu\text{l}$
- 
- 25  $\mu\text{l}$

- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 2 heures.
- Vortexer les tubes à faible vitesse pendant 5 à 10 secondes.
- Remettre à 37°C pendant une nuit (16 à 18 heures)
- Révéler le profil de restriction sur gel d'agarose à 0,5%.

### 9. 3. 2. Ligation avec l'adaptateur Genome Walker

Les fragments d'ADN issus de la digestion enzymatique sont ligués avec l'adaptateur Genome Walker fourni par le kit « Universal Genome Walker » de séquence connue (**Figure 22**) [202].



**Figure 22:** Structure de l'adaptateur Genome Walker et des amorces de l'adaptateur.

Dans chaque tube, transférer 4 µl de l'ADN ATCC 13048 purifié et digéré, ajouter :

- 1,9 µl Adaptator Genome Walker 25 µM
- 1,6 µl tampon de ligation 10X.
- 0,5 µl T4 DNA ligase
- Incuber à 16°C pendant une nuit.
- Pour arrêter les réactions, incuber à 70°C (au bain-marie ) pendant 5 min.
- Pour chaque tube, ajouter 72 µl de TE ( pH 7,4 ).
- Vortexer à faible vitesse pendant 10 à 15 secondes.

### 9. 3. 3. Détermination des amorces

Les amorces A<sub>351</sub>, A<sub>352</sub>, B<sub>351</sub>, B<sub>352</sub> sont déterminées sur le fragment obtenu de l'ADN génomique de la souche de référence d'*E.aerogenes* ATCC 13048 qui fait 650 pb, analogue au gène ompK 35 chez *Klebsiella pneumoniae* par le programme Primers !: <http://www.williams stone.com> .

**A<sub>351</sub>** : 5'- TGTAGTTCAGCCGTCGCCGCC- 3'

**A<sub>352</sub>** : 5'- CGCCGTTGGTACGGCCGGTCATG- 3'

**B<sub>351</sub>** : 5'- GTTGACCAGAACTGACGAGCAAGG- 3'

**B<sub>352</sub>** : 5'- TTACAACATGACGCCGGAAGAAGAT- 3'

Les amorces AP 1 et AP 2 sont fournies dans le kit « Universal Genome Walker »

**AP 1** : 5'- GTAATACGA CTA ACTATAGGGC-3'

**AP 2** : 5'- ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'

### 9. 3. 4. Amplification par PCR (primaire et secondaire)

#### - PCR « Genome Walker » :

Chaque brin d'ADN génomique ATCC 13048 digéré et ligé avec l'adaptateur Genome Walker, subit deux séries d'amplification par PCR successives : une PCR primaire utilisant des amorces externes AP1/ A<sub>351</sub> du côté 3'OH et AP1/ B<sub>351</sub> du côté 5'P suivie d'une PCR secondaire utilisant des amorces internes AP2/A<sub>352</sub> (3'OH) et AP2/B<sub>352</sub> (5'P).

**PCR primaire :**

- Dans chaque tube (0,5ml) : 29  $\mu$ l H<sub>2</sub>O stérile
  - 5  $\mu$ l tampon 10X pour Tth
  - 5  $\mu$ l dNTP.
  - 3  $\mu$ l Mg (OAC)<sub>2</sub> 25 mM
  - 1  $\mu$ l AP1
  - 5  $\mu$ l amorce 2 (A<sub>351</sub>, B<sub>351</sub>)
  - 1  $\mu$ l ADN ATCC 13048 ligué
  - 1  $\mu$ l Tth DNA polymérase

---

50  $\mu$ l

- Le programme est : 7 cycles : 94°C 25 sec
  - 72°C 3 min
- 32 cycles : 94°C 25 sec
  - 67°C 3 min
- après le dernier cycle 67°C 7 min

- Révélation de la PCR sur gel d'agarose à 1%.

**PCR secondaire :**

- Dans chaque tube de 0,5ml : 29  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
  - 5  $\mu$ l tampon 10X pour Tth
  - 5  $\mu$ l dNTP
  - 3  $\mu$ l Mg (OAC)<sub>2</sub> 25 mM
  - 1  $\mu$ l AP2
  - 5  $\mu$ l amorce 2 (A<sub>352</sub>, B<sub>352</sub>)
  - 1  $\mu$ l DNA issu de la PCR primaire
  - 1  $\mu$ l Tth DNA polymérase

---

50  $\mu$ l

- Le programme est : 5 cycles : 94°C 25 sec
  - 72°C 3 min
- 20 cycles : 94°C 25 sec
  - 67°C 3 min
- après le dernier cycle : 7 min à 67°C

- Révélation de la PCR sur gel d'agarose 1% .

### 9. 3. 5. Séquençage du gène complet analogue à ompK 35

- Les produits de PCR secondaires Genome Walker (50 ng) sont insérés dans le plasmide pGEM-T (Promega) puis transformés dans *Escherichia coli* JM109 compétentes.
- La sélection après clonage est réalisée sur milieu LB additionné de 50 µg/ ml d'ampicilline, 200 µg/ ml d'IPTG et 32 µg/ ml d'X-Gal.
- Les plasmides sont extraits par le kit « Wizard Plus SV Minipreps »
- Vérifier sur gel d'agarose à 1%
- Après avoir été purifiés ; les plasmides extraits sont envoyés en Allemagne, au laboratoire Eurogentec pour être séquençé avec les amorces universelles T7, SP6 et les amorces internes déterminées sur le gène analogue ompK 35 (A<sub>351</sub>, A<sub>352</sub>, B<sub>351</sub>, B<sub>352</sub>)
- La réponse (séquences partielles) est obtenue au bout de 3 à 4 jours par e-mail.
- Un traitement bioinformatique est alors effectué pour assembler les séquences partielles, comparer la séquence obtenue à des séquences nucléotidiques présentes dans la banque de données afin de l'identifier.

## 10. TRAITEMENT BIOINFORMATIQUE

### 10. 1. Choix des amorces

Les conditions optimales des amorces ont été déterminées par le logiciel Primers ! :

<http://www.williams stone.com>.

### 10. 2. Assemblage de séquences

L'assemblage des séquences partielles en une séquence unique a été effectué à l'aide du logiciel Autoassembler (Applied Biosystems, Perkin- Elmer, USA). Les ambiguïtés éventuelles sont vérifiées par comparaison des électrophorégramme.

### 10. 3. Recherche d'homologie et alignement de séquences

Nous avons utilisé le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible sur le serveur NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Ce logiciel compare la séquence à identifier à des séquences nucléotidiques présentes dans la banque de données GENBANK (National Center for Biotechnology Information, USA) en utilisant les conditions suivantes : 20 paire de bases en commun au minimum, avec 10% d'erreur au maximum entre les séquences alignées.

Les alignements multiples avec le génome de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* sont réalisés grâce au logiciel CLUSTALAW disponible sur le serveur infobiogen : <http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalaw-in.pe>.

### 10. 4. Carte de restriction

Nous avons déterminé la carte de restriction du gène putatif ompEa 35 où les enzymes sont triés des plus rares aux plus fréquents grâce au logiciel carteres disponible sur le serveur infobiogen : [http://www.infobiogen.fr/analyseq/cgi-bin/carteres\\_outpl](http://www.infobiogen.fr/analyseq/cgi-bin/carteres_outpl).

## 11. ROLE DE LA PORINE OmpEa 35 DANS LE RETOUR A LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Dans le but de déterminer le rôle de la porine OmpEa 35, cette dernière a été soumise au contrôle de son propre promoteur puis au contrôle du promoteur lacZ.

### 11. 1. La porine OmpEa 35 sous le contrôle de son promoteur

Afin de déterminer le rôle du gène putatif de la porine OmpEa 35 analogue à OmpK 35 chez *Enterobacter aerogenes*, le gène OmpEa 35 est cloné dans le vecteur pGEM-T, puis transformé dans *E.coli* JM109 compétentes.

## 11. 1. 1. Réactifs utilisés

- Kit pGEM-T (voir 7. 3)
- JM109 compétentes
- Kit Wizard Plus SV Minipreps (voir 8.3)
- 30 µl Sal I (10 unités / µl), New England
- 100 µl tampon de restriction (New England) NE buffer Sal I [150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothreitol pH 7,9 à 25°C]
- BSA (serum albumine bovine) 100 µg/ml
- 2 µg cassette kanamycine (GenBlock, Pharmacia)
- 10 µg T4 DAN Ligase (6 unités/ µl), Gibco
- 40 µg tampon de ligation 10x , Gibco
- *E.aerogenes* 289 : porine (-), Kanamycine sensible
- *E.cloacae* RM3: porine (-), Kanamycine sensible [133].
- LB liquide, LB solide
- 200 µm /ml IPTG
- 32 µm /ml X-Gal
- solution d'ampicilline 50 µg /ml
- solution de kanamycine 25 µg/ml

## 11. 1. 2. Protocole

➤ Après transformation du plasmide recombinant pGEM-T/ ompEa 35 dans JM109, la sélection des clones recombinants se fait sur milieu LB solide additionné de 50 µg/ ml d'ampicilline, 200 µg/ ml d'IPTG et 32 µg/ml d'X-Gal. Les plasmides sont extraits par le Kit Wizard Plus SV Miniprep.

➤ Digestion : Etant donné que les souches Ea289 et RM3 sont kanamycine sensibles, donc avant de transformer dans ces souches, le plasmide recombinant pGEM-T/ ompEa 35 est ligué à une cassette kanamycine pour la sélection, pour cela il doit être digéré par Sal I.

\* Digestion du plasmide pGEM-T/ OmpEa 35 par l'enzyme Sal I :

- plasmide pGEM-T/ ompEa 35.....4 µl
- tampon de restriction NE buffer Sal I.....1 µl
- Sal I (10 unités/ µl).....1 µl
- H<sub>2</sub>O stérile.....4 µl

---

10 µl

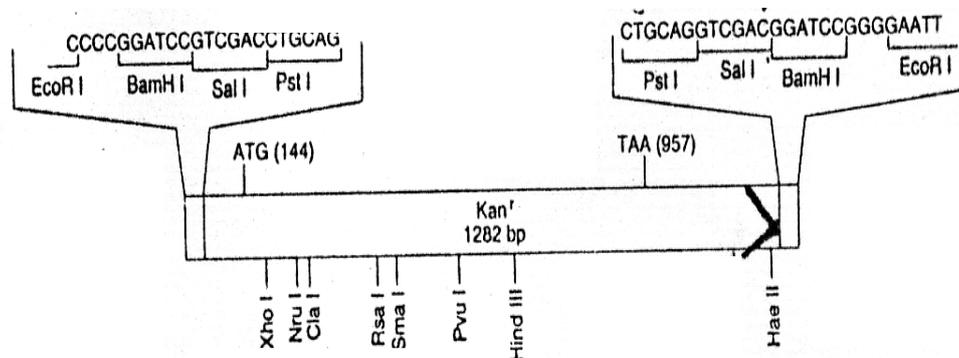
- Incuber pendant 3 heures à l'étuve à 37°C.
- Inactiver le plasmide recombinant digéré par Sal I à 65°C au bain- marie pendant 20 minutes.
- Ligation avec la cassette kanamycine (Kanamycin Resistance GenBlock (EcoR I), Pharmacia), c'est un fragment du vecteur pUC4K qui fait approximativement 1300 pb et qui contient le gène de la résistance qui provient du transposon Tn 903. Ce dernier, code pour l'enzyme amino-glycoside 3' phosphotransférase, qui confère la résistance à la kanamycine, néomycine et G-418 (**Figure 23**).

La présence des sites Bam H 1, Sal I, Acc I et Pst I à chaque extrémité, fait de sorte que ce GenBlock est un gène exceptionnellement adaptable.

- Plasmide recombinant.....4 µl
- Casette kanamycine.....4 µl
- Tampon 10 X de ligase.....1 µl
- T4 DNA ligase.....1 µl

10 µl

- Incuber pendant une nuit à 4°C.



**Figure 23** : Casette kanamycine

➤ Transformation : le plasmide pGEM-T/ ompEa 35/ Kn est transformé dans les souches *E.aerogenes* 289 et *E.cloacae* RM3 compétentes, ces souches sont caractérisées par l'absence de porine et la sensibilité à la kanamycine.

La sélection des clones ayant incorporés le plasmide pGEM-T/ ompEa 35 / Kn, se fait sur milieu LB solide additionné de 25 µg/ ml de kanamycine, 200 µg/ ml IPTG et 32 µg/ ml X-Gal.

➤ Test de sensibilité aux antibiotiques :

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est réalisée en bouillon Mueller Hinton (MH).

Les essais sont réalisés en triple pour les souches Ea 289 et RM3 en présence et en absence de la porine 35 pour voir l'impact de cette porine sur les antibiotiques.

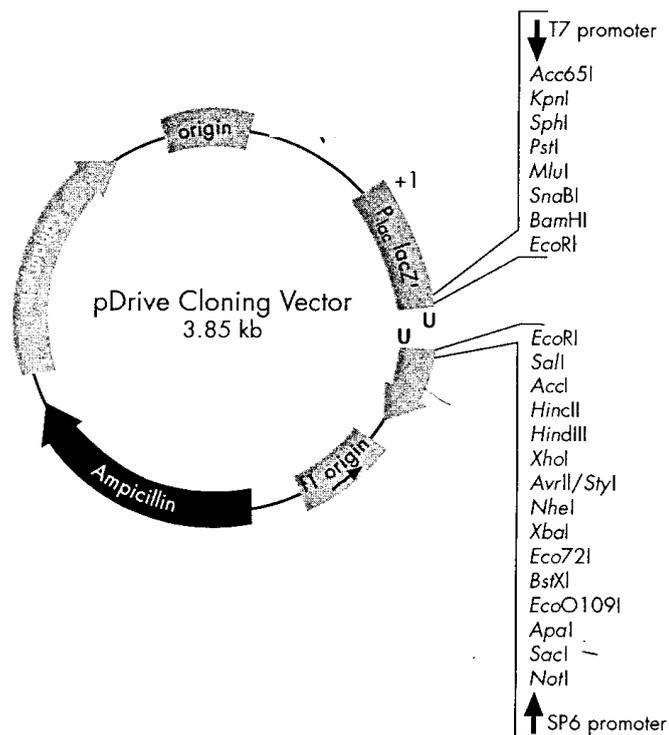
Les antibiotiques testés sont : imipénème (IMP), céfépime (FEP), céftazidime (CAZ), norfloxacine (NOR) et céfotaxime (CTX).

La série des tubes est placée dans l'étuve à 37°C pendant 18 heures.

## 11. 2. La porine OmpEa 35 sous le contrôle du promoteur Lac Z

Dans le but de voir si le non fonctionnement de la porine 35 d'*Enterobacter aerogenes* est dû à une régulation de son promoteur, des amorces TP<sub>351</sub> et TP<sub>352</sub> ont été choisies par le logiciel Primers !, déterminées sur la séquence du gène ompEa 35 et seront utilisées pour amplifier par PCR la séquence du gène ompEa 35 sans le promoteur, qui sera clonée par la suite dans le vecteur pDrive de QIAGEN PCR cloning kit, sous le contrôle du promoteur lacZ et transformé dans la souche Ea 289.

Le pDrive cloning vector est un plasmide de 3,85 Kb (**Figure 24**) fourni sous forme linéaire avec deux extrémités uracile pour cloner des produits de PCR à extrémité Adénine générées par la Taq ou autre DNA polymérase non proofreading. Il permet une sélection ampicilline et kanamycine par screening bleu- blanc [200].



**Figure 24:** La carte du vecteur pDrive [200]

### 11. 2. 1. Réactifs utilisés

- ADN ATCC 13048
- Amorces (TP<sub>351</sub>, TP<sub>352</sub>, T<sub>354</sub>)
- ELongase Enzyme mix 100 µl ( Life Technologies)
- Tampon ELongase B 5X [ 300 mM tris- SO<sub>4</sub> ( pH 9,1 ) à 25°C, 90mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> et 100 mM Mg SO<sub>4</sub>]
- Désoxyribonucléotides dNTP
- H<sub>2</sub>O stérile
- Le vecteur de clonage p Drive Amp<sup>R</sup>, Kn<sup>R</sup> (QIAGEN)
- XLI Blue compétentes : *E.coli* K12, TC<sup>R</sup>, haute efficacité de transformation
- LB liquide, LB solide
- IPTG
- X-Gal
- Solution de kanamycine

## 11. 2. 2. Protocole

## ➤ Amplification par PCR :

Le mélange de PCR est constitué de :

- 1  $\mu$ l d'ADN génomique ATCC 13048
- 10  $\mu$ l tampon Elongase B 5X
- 2  $\mu$ l dNTP
- 5  $\mu$ l TP<sub>351</sub>, TP<sub>352</sub>
- 5  $\mu$ l T<sub>352</sub>, T<sub>354</sub>
- 1  $\mu$ l ELongase Enzyme Mix
- 26  $\mu$ l H<sub>2</sub>O stérile

---

50  $\mu$ l

Le programme d'amplification est :

94°C	94°C	52°C	68°C
3min	30sec	30sec	4min

35 cycles

- Vérifier l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

## ➤ Clonage avec pDrive :

- Le produit de PCR issu de l'amplification à l'aide des amorces TP<sub>352</sub>/ T<sub>354</sub> est ligué au vecteur p Drive, comme suit :

- Le vecteur pDrive (50 ng/  $\mu$ l).....1  $\mu$ l
- Mix de ligation.....5  $\mu$ l
- Produit de PCR ..... 4  $\mu$ l

---

10  $\mu$ l

- Incuber à 4°C pendant une nuit.
- Transformer le plasmide recombinant pDrive/ompEa 35 dans *E.coli* XLI Blue compétentes.
- La sélection des souches XLI Blue ayant incorporé le plasmide recombinant, se fait sur milieu LB additionné de 30  $\mu$ /ml de kanamycine, 20  $\mu$ g/ ml IPTG et 32  $\mu$ g/ml X-Gal.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 heures.
- Lecture : le X-Gal est converti en produit bleu si le gène lacZ est intact et provoqué par l'IPTG, ainsi les recombinants croissent comme des colonies blanches.
- Pour analyser les plasmides recombinants l'extraction est réalisée à l'aide du kit Wizard Plus SV Miniprep.

➤ Digestion enzymatique :

Pour vérifier si l'insertion du gène OmpEa 35 (sans promoteur) est dans le bon sens dans le vecteur pDrive, nous avons réalisé une digestion enzymatique par EcoR I et séparément par Kpn I du plasmide recombinant pDrive/ ompEa 35 :

➤ Digestion par EcoR I:

▪ plasmide.....	5 µl
▪ tampon H 10X.....	1,5 µl
▪ EcoR I.....	1 µl
▪ H <sub>2</sub> O stérile.....	7,5 µl
	15 µl

➤ Digestion par Kpn I:

▪ plasmide.....	5 µl
▪ tampon L 10 X .....	1,5 µl
▪ Kpn I.....	1 µl
▪ H <sub>2</sub> O stérile.....	7,5 µl
	15 µl

- Vérifier les digestions par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

➤ Transformation dans *E.aerogenes* 289 :

Une fois le bon plasmide est repéré (contenant l'insert dans le bon sens), il sera transformé dans la souche Ea289.

➤ Test de sensibilité aux antibiotiques :

La détermination des concentration minimales inhibitrices (CMI) est réalisée en bouillon Mueller Hinton (MH). Les essais sont réalisés en triple pour la souche Ea289 en présence et en absence de la porine OmpEa 35 pour voir si la porine sous le contrôle d'un autre promoteur est fonctionnelle.

Les antibiotiques testés sont : imipénème (IMP), céfépime (FEP), ceftazidime (CAZ), ceftazidime + acide clavulanique (2 µl/ ml) (CAZ+ Ac),et norfloxacin (NOR).

La série des tubes est placée dans l'étuve à 37°C pendant 18 heures.

## 12. ETUDE DES SEQUENCES DES GENES DE SOUCHES CLINIQUES A *E.aerogenes*

A partir de la séquence du gène de la porine analogue à OmpK 35, nous avons déterminé des amorces à l'extérieur du gène au niveau de l'opérateur ; T<sub>351</sub> , T<sub>352</sub> et après le codon stop du gène T<sub>353</sub>, T<sub>354</sub> . Ce-ci est réalisé dans le but d'amplifier par PCR le gène de la porine OmpEa 35 analogue à OmpK 35 de la souche de référence et de six souches cliniques d'*Enterobacter aerogenes*. Les caractéristiques de ces souches comme leurs profils de sensibilité aux antibiotiques sont citées dans le **tableau 5**.

### 12. 1. Amplification par PCR

Le mélange de PCR est constitué de :

- 1 µl ADN génomique
- 5 µl tampon 10X
- 2 µl dNTP
- 5 µl amorce T<sub>351</sub> , T<sub>352</sub>
- 5 µl amorce T<sub>352</sub> , T<sub>354</sub>
- 1 µl Taq DNA polymérase
- 31 µl H<sub>2</sub>O stérile

---

50 µl

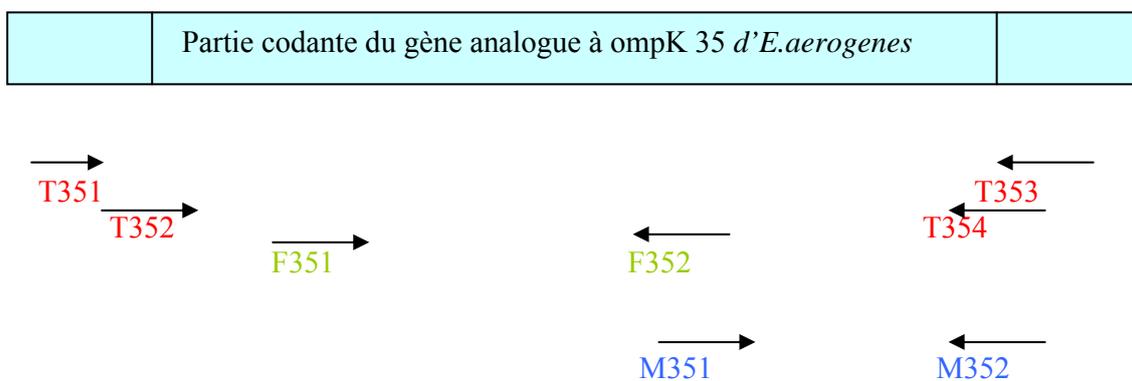
- Le programme d'amplification est :
- |      |           |      |      |      |
|------|-----------|------|------|------|
| 94°C | 35 cycles |      |      | 72°C |
| 3min | 94°C      | 48°C | 72°C | 7min |
|      | 1min      | 1min | 1min |      |
- Vérifier l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### 12. 2. Séquençage

- Purifier les produits d'amplification par PCR avec les amorces T<sub>351</sub>, T<sub>354</sub>, sur colonne Amicon Microcon PCR (QIAGEN).
- Envoyer au laboratoire Eurogentec, les produits de PCR purifiés pour être séquencés avec les mêmes amorces qui ont servi à l'amplification ; les amorces externes T<sub>351</sub>, T<sub>354</sub> mais aussi avec des amorces internes F<sub>351</sub>, F<sub>352</sub>, M<sub>351</sub> et M<sub>352</sub> , déterminées sur le gène putatif analogue à ompK 35 de la souche de référence *E.aerogenes* ATCC 13048 .

- **T<sub>351</sub>** : 5'-TTG ATT GAG TTC ACA AAG TT- 3'
- **T<sub>352</sub>** : 5'-AGG TTC CTT GTG ATT ACT G- 3'
- **T<sub>353</sub>** : 5'- TAT GAG AAG GTG ACA ATC TT - 3'
- **T<sub>354</sub>** : 5'- GGT AGG ATT TAC AAA TTG C - 3'
- **F<sub>351</sub>** : 5'- CCA ATT TAC GAT ATT GGT AG - 3'
- **F<sub>352</sub>** : 5'- CAT GAA GTT ATC GGT GTA GT - 3'
- **M<sub>351</sub>** : 5'- GAA CTA CAC CGA TAA CTT CA - 3'
- **M<sub>352</sub>** : 5'- TAG GCA TTA TCA TCC AGT T - 3'

- La **figure 25** montre la position de ces différentes amorces:



**Figure 25** : Position des amorces sur le gène de la porine ompEa 35 de la souche ATCC 13048

### 12. 3. Alignement de séquences

L'alignement multiple de gènes analogues à ompK 35, sous forme d'acides aminés, de six souches cliniques (3, 5, 19, 27, I320, C50249) et de la souche de référence ATCC 13048 a été réalisé par le logiciel CLUSTALAW, afin d'identifier les mutations.

## 13. SUREXPRESSON ET PURIFICATION DE LA PORINE OmpEa 35

Pour étudier les mécanismes physico- chimiques qui régissent le fonctionnement de la porine OmpEa 35, nous avons envisagé de surproduire la protéine et de la purifier.

Le gène ompEa 35 d'*E.aerogenes* a été amplifié et cloné dans le vecteur d'expression pET 24 a<sup>+</sup>, sous le contrôle d'un promoteur du phage T7 en phase avec une séquence codant une extension hexahistidine C- terminale 6 His, [160, 171, 199].

Nous avons choisi d'exprimer ompEa 35 à partir du vecteur pET 24 a<sup>+</sup> pour trois raisons. Premièrement, les vecteurs pET (plasmid for expression by T7 RNA polymerase) permettent d'exprimer des gènes à partir d'un promoteur fort du phage T7 [199]. Deuxièmement, la surproduction de protéines membranaires étant souvent toxique chez *E.coli* les gènes d'intérêt doivent être réprimés jusqu'à l'induction de la surexpression.

Le vecteur pET 24 a<sup>+</sup> permet un contrôle *via* le répresseur Lac I et l'opérateur lac situé *en aval* du promoteur T7. Enfin, le clonage en phase dans pET 24a<sup>+</sup> permet de prolonger les protéines d'intérêt par un hexapeptide d'histidine en C-terminal. Ce motif permet de purifier les protéines recombinantes par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel ou d'autres métaux (cuivre, cobalt ou zinc) [199].

Le système T7, est donc utilisable uniquement pour surexprimer des gènes dont les produits ne sont pas toxiques pour l'hôte. Dans le cas contraire, pour réduire l'activité de base de l'ARN polymérase T7 (et donc accroître la tolérance des gènes cibles), on peut utiliser une souche d'expression portant le plasmide pLys S. Celui-ci code le lysozyme T7, un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase T7.

Deux souches d'*E.coli* ; BL21(DE3) et BL21(DE3) pLysS qui sont lysogène pour le phage DE3 dérivé du phage  $\lambda$  et qui portent l'ARN polymérase du phage T7, ont été testées pour parvenir à une production suffisante de la protéine [106].

La porine a été purifiée par colonne Ni-NTA (QIAgen) qui lui permettra d'être épurée facilement par une étape de fixation spécifique [197].

### 13. 1. Réactifs utilisés

- ADN ATCC 13048
- ELongase Enzyme Mix 100  $\mu$ l
- Tampon B ELongase 5X
- dNTP
- Amorces (P<sub>351</sub>, P<sub>352</sub>)
- Kit Amicon Microcon PCR Purification
- Acétate de sodium 3 M
- Ethanol (90%, 70%)
- TE (50 Mm Tris- Hcl (pH 8,0), 2 mM EDTA)
- Lysozyme 100  $\mu$ g /ml
- Triton X-100
- Tampon A: 20 Mm Tris- Hcl (pH 8,0), 100 mM Nacl
- Mgcl<sub>2</sub> 20 mM

- Tampon de fixation 20 mM Tris-Hcl (pH 8,0), 0,5 M Nacl, 5 mM Imidazole
- EDTA
- Kit Concert Gel Extraction Systems GibcoBRL , contenant :
  - Tampon de solubilisation (L1) Gel solubilization buffer : perchlorate de sodium, acétate de sodium et TBE (Tris- Borate EDTA).
  - Tampon de lavage (L2) Wash buffer : Nacl, EDTA, Tris-Hcl
  - Tampon TE (TE buffer) : 100 mM Tris- Hcl (pH 8,0), 0,1 M EDTA
  - Cartouches contenant des membranes de silice.
- Kit Ni- NTA, contenant :
  - Tampon de lyse 5 mM Imidazole
  - Tampon de lavage 20 mM Imidazole
  - Tampon d'éluion 250 mM Imidazole
  - Colonnes Ni- NTA

### 13. 2. Préparation de l'insert

Afin de produire OmpEa 35-6 His dans la membrane externe, le cadre de lecture ouvert OmpEa 35 a été amplifié par PCR en utilisant le couple d'amorces P<sub>351</sub> (Nde I- ompEa 35) et P<sub>352</sub> (ompEa 35- Xho I), cloné dans un vecteur de clonage pGEM-T ou pET 24 a<sup>+</sup>, purifié sur gel après digestion par les enzymes de restriction Nde I et Xho I pour être sous-cloné par la suite entre les sites Nde I et Xho I du vecteur d'expression p ET 24a<sup>+</sup> [197, 199].

Les amorces P<sub>351</sub> et P<sub>352</sub> ont été choisies par le logiciel Primers ! de façon à :

- Ajouter les sites de restriction convenables Nde I, Xho I permettant le sous-clonage dans le vecteur d'expression pET 24 a<sup>+</sup>.
- Etre dans le même cadre de lecture (en phase) du promoteur T7.

Les hôtes pour clonage souhaitables sont des souches d'*E.coli* K12 : HMS174, HB101, JM109 et XLI Blue. Ces souches sont des hôtes convenables pour maintenir les plasmides car elles sont rec A<sup>-</sup> et donnent une haute efficacité de transformation [199].

#### 13. 2. 1. Amplification par PCR

Nous avons amplifié par PCR, le cadre de lecture ouvert ompEa 35 à l'aide des morces P<sub>351</sub> et P<sub>352</sub>, déterminées sur la partie codante du gène analogue à ompK 35 d'*E.aerogenes*.

- **P<sub>351</sub>** : 5'- TAT ACA TAT GAT GAA GCG CAA TAT TCT - 3'
- **P<sub>352</sub>** : 5'- TAT ACT CGA GGA ACT GGT AAA CGA TAC CAA - 3'

Les amorces contiennent les sites de restriction Nde I ou Xho I pour cloner le produit d'amplification en phase entre le sites Nde I et Xho I du vecteur pET 24 a<sup>+</sup>.

La figure montre la position des amorces P<sub>351</sub> et P<sub>352</sub>.

Le mélange de PCR est constitué de :

- 1 µl ADN ATCC 13048
- 10 µl tampon B d'Elongase5 X
- 2 µl d NTP
- 5 µl amorce P<sub>351</sub>
- 5 µl amorce P<sub>352</sub>
- 1 µl Elongase Enzyme Mix
- q.s.p . 50 µl H<sub>2</sub>O stérile

- Le programme d'amplification est comme suit :

	35 cycles		
94°C	94°C	50°C	68°C
3 min	30sec	30 sec	4min

- Vérifier l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### 13. 2. 2. Ligation avec le pGEM-T

Après purification par kit « Amicon Microcon PCR Purification », le produit de PCR est cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega) :

- |                                |       |   |                                    |
|--------------------------------|-------|---|------------------------------------|
| ▪ vecteur pGEM-T ( 50 ng)..... | 1 µl  | } | Incuber à 4°C pendant<br>une nuit. |
| ▪ produit de PCR purifié.....  | 3 µl  |   |                                    |
| ▪ tampon de ligation 2X.....   | 5 µl  |   |                                    |
| ▪ Ligase.....                  | 1 µl  |   |                                    |
|                                | 10 µl |   |                                    |

Transformer la ligation mixe pGEM-T/ ompEa 35 dans XLI Blue compétentes.

La sélection des clones ayant incorporé le plasmide recombinant pGEM-T/ OmpEa 35 se fait par screening bleu / blanc sur milieu LB solide additionné de 50 µg/ ml d'ampicilline, 200 µg/ ml IPTG et 32 µg/ ml X-Gal après incubation à l'étuve à 37°C pendant 18 heures.

### 13. 2. 3. Analyse des plasmides recombinants

Pour s'assurer de l'insertion du fragment cible et savoir son orientation par rapport au vecteur pGEM-T, les plasmides sont extraits par le kit « Wizard Plus SV Miniprep » et digérés par l'enzyme Nde I sachant qu'il n'y a pas de site Nde I sur l'amorce P<sub>351</sub> et sur le polylinker en position 82 du vecteur pGEM-T. La digestion est réalisée comme suit :

▪ plasmide extrait.....	4 µl	} Incuber à 37°C pendant 2 heures.
▪ tampon B de restriction 10 X.....	1,5 µl	
▪ Nde I.....	1 µl	
▪ H <sub>2</sub> O stérile.....	8.5 µl	
	15 µl	

- Vérifier la digestion enzymatique par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### 13. 2. 4. Digestion enzymatique par Xho I et Nde I

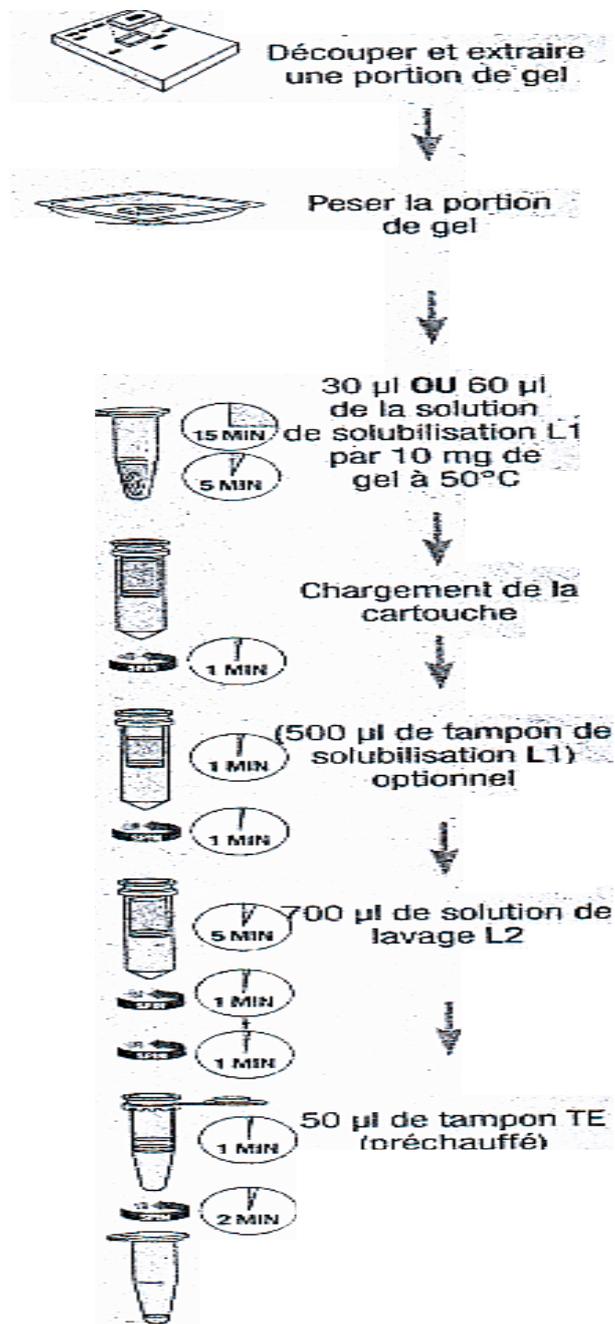
Les plasmides recombinants sont digérés par Nde I et Xho I :

▪ plasmide recombinant pGEM-T/ OmpEa 35.....	16 µl	} Incuber à 37°C pendant 2 heures.
▪ Nde I.....	1 µl	
▪ Xho I.....	1 µl	
▪ Tampon H de restriction 10X.....	2 µl	
	20 µl	

- Vérifier la digestion enzymatique par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### 13. 2. 5. Purification de bande par kit Concert Gel Extraction Systems GibcoBRL

Le kit Gel Extraction Systems est désigné pour purifier des fragments d'ADN à partir de gel d'agarose, il utilise des cartouches contenant des membranes de silices qui captent et purifient l'ADN. L'adsorption à la silice est influencée par la composition des tampons et la température. L'extraction est rapide en 25 à 30 minutes (**Figure 26**) [195].



**Figure 26** : Protocole de purification par le kit Cnocert Gel Extraction System

Toutes les étapes de centrifugation doivent se faire à température égale à 20-22°C.

1. Excision de la partie du gel : couper la portion du gel contenant le fragment d'ADN cible, en utilisant une lame fine et propre. Minimiser la quantité découpée avec le fragment.
  2. Poids de la partie du gel découpée : peser la portion du gel. Pour les gels d'agarose  $\leq 2\%$ , placer au maximum 400mg de gel dans le tube en polypropylène de 1.5 ml. Utiliser plusieurs tubes si nécessaire. Ajouter 30  $\mu\text{l}$  de tampon de solubilisation (L1) par 100 mg de gel.
  3. Solubilisation du gel : incuber à 50°C pendant au moins 15 min. Lorsque le morceau du gel est dissous, incuber pendant 5 min supplémentaire.
  4. Chargement de la cartouche : placer une cartouche à centrifuger dans un tube de lavage de 2ml. Déposer le mélange obtenu à l'étape 3 sur la cartouche. Centrifuger le mélange avec une microcentrifugeuse à  $\geq 12000$  g pendant 1 min. Eliminer la solution filtrée. Remarque : ne pas charger plus de 400 mg de gel par cartouche.
  5. (Prélavage de la cartouche optionnel) : Replacer la cartouche dans un tube de lavage. Déposer 500  $\mu\text{l}$  de tampon de solubilisation (L1) sur la cartouche. Incuber à 20-22°C pendant 1 min, ensuite centrifuger à  $\geq 12000$  g pendant 1 min. Eliminer la solution filtrée. Remarque : Cette étape de lavage est recommandée lorsque plus de 250 mg de gel ont été chargé sur la cartouche ou si une pureté plus importante est nécessaire, pour des applications telles que le séquençage d'ADN ou la transcription *in vitro*.
  6. Lavage de la cartouche : placer la cartouche dans un tube de lavage de 2 ml . Déposer 700  $\mu\text{l}$  de tampon de lavage (L2) (contenant de l'éthanol )au sommet de la cartouche et incuber pendant 1 min. Eliminer la solution filtrée. Centrifuger une fois de plus pour éliminer tout résidu de la solution de lavage.
  7. Elution de l'ADN: Placer la cartouche dans le tube 1,5ml de récupération (fourni). Déposer 50  $\mu\text{l}$  de tampon TE préchauffé directement au centre du sommet de la cartouche. Incuber à 20-22°C pendant 1 min puis centrifuger à  $\geq 12000$ g pendant 2 min.
- L'ADN élué est conservé à 4°C jusqu'à utilisation pour le liguer au vecteur d'expression pET 24 a<sup>+</sup>.

### 13. 3. Préparation du vecteur d'expression pet 24 a<sup>+</sup> (Novagen):

Le vecteur pET a été construit par Studier et al. (Studier et Moffatt, 1986 ; Rosemberg et al., 1987 ; Studier et al, 1990). Il existe deux catégories du vecteur : vecteur de transcription et vecteur de traduction [199].

pET 24 a<sup>+</sup> fait 5310 pb, porte le gène codant la résistance à la kanamycine (**Figure 27**), correspond au cadre de lecture relatif au site de clonage BamH I reconnaissant la séquence GGATCC. Le (+) indique que le vecteur contient fl, origine de replication.

#### 13. 3. 1. Digestion enzymatique

Le vecteur d'expression pET 24 a<sup>+</sup>, est digéré par Nde I et Xho I, les mêmes enzymes de restriction qui ont servi à préparer l'insert OmpEa 35.

▪ pET 24 a <sup>+</sup> .....	10 µl	} Incuber à 37°C pendant 2 heures.
▪ Nde I.....	1 µl	
▪ Xho I.....	1 µl	
▪ Tampon H de restriction.....	2 µl	
▪ H <sub>2</sub> O stérile.....	6 µl	
	10 µl	

- Vérifier la digestion enzymatique par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%.

#### 13. 3. 2. Purification de bande à partir du gel

La bande sur gel d'agarose 1,5%, correspondant au vecteur pET 24 a<sup>+</sup> ≈ 5,3 Kb avec le kit Concert Gel Extraction Systems GibcoBRL (voir 13. 2. 5) [195].



## 13. 4. Sous- clonage de l'insert dans le vecteur pET 24 a<sup>+</sup>

### 13. 4. 1. Ligation

Le sous-clonage est le transfert simple d'un fragment cloné de l'ADN d'un vecteur à un autre, celui-ci peut être utilisé pour l'étude approfondie d'une courte région d'un gros fragment cloné ou pour transférer un gène vers un vecteur désigné pour s'exprimer dans des espèces particulières [171].

L'insert préparé ompEa 35 est sous-cloné dans le vecteur d'expression pET 24a<sup>+</sup>.

Le mix de ligation est comme suit :

▪ pET 24 a <sup>+</sup> .....	3 µl	} Incuber à 4°C pendant une nuit.
▪ insert ompEa 35.....	3 µl	
▪ tampon de ligation 10 X.....	1,5 µl	
▪ T4 DNA Ligase.....	1 µl	
▪ H <sub>2</sub> O stérile.....	<u>6,5 µl</u>	
	15 µl	

### 13. 4. 2. Transformation

L'expression est réalisée dans des souches spéciales d'*E.coli* ; BL21 ( DE3) et BL21 (DE3) pLys S, lysogènes pour le phage DE3, dérivé du phage λ, qui produit l'ARN polymérase T7 après induction avec l'IPTG [106, 199]. L'enzyme est très efficace et transcrit uniquement à partir du promoteur T7, conduisant en cas favorables, à la production de la protéine cible jusqu'à 30% du total de la protéine de *E.coli*.

\* **BL21 (DE3)** : *E.coli* B lon, ompT, lysogène pour λ (DE3) qui porte l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur lac UV5.

\* **BL21 (DE3) pLys S** : p Lys S code le lysozyme du phage T7, Cm<sup>R</sup>.

La sélection des souches BL21 (DE3) et BL21 (DE3) pLys S transformées se fait sur milieu LB additionné de 30 µg/ml de kanamycine pour les souches BL21 (DE3) et sur milieu LB additionné de 30 µg/ml de chloramphénicol pour les souches BL21(DE3) pLys S.

Les plasmides sont extraits par le kit Wizard Plus SV Miniprep, et analysés par digestion enzymatique avec les enzymes de restriction Nde I et Xho I.

Vérifier la digestion enzymatique par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%.

### 13. 5. Conditions d'expression

Les souches d'*E.coli* testés pour la production de protéines recombinantes portent sur leur chromosome le gène de l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle d'un promoteur inductible par IPTG. Les souches portant les plasmides d'expression ont été cultivées à 37°C jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,6. L'expression des protéines a alors été induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG et l'incubation a été poursuivie pendant 4 heures à 37°C. Les cultures ont été centrifugées et les culots conservés à 20°C [106, 199].

### 13. 6. Obtention des lysats cellulaires totaux

Les prélèvements (0,5 ml) de cultures non induites et induites ont été centrifugés. Les culots ont été resuspendus dans 50 µl de tampons de lyse (100 mM Tris- Hcl (pH 6,8), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 4% SDS, 10% glycérol, 5% β-mercaptophénol, 0,01% bleu de bromophénol), vortexés énergiquement pendant 1 min puis recentrifugés. Les surnageants ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Vérifier les lysats cellulaires totaux par SDS-PAGE [106, 198].

### 13. 7. Préparation des fractions solubles et insolubles

Les culots cellulaires correspondant à 20 ml de culture ont été resuspendus dans 2 ml de TE (50 mM Tris-Hcl (pH 8,0), 2 mM EDTA) contenant du lysozyme (100 µg/ml final) et du Triton X-100 (0,1% final). Pour les souches portant le plasmide pLysS, le lysozyme a été omis : la décongélation et l'addition de détergents doux suffisent à lyser efficacement les cellules.

Les suspensions ont été soniquées dans la glace jusqu'à obtention d'un lysat clair.

Les surnageants contenant les protéines cytoplasmiques et périplasmiques solubles ont été séparés des culots enrichis en fractions membranaires et contenant les corps d'inclusion éventuels par centrifugation (12000 xg , 20 min à 4°C).

Les culots ont été resuspendus dans 1 ml de TE.

Vérifier les fractions solubles et insolubles par SDS-PAGE [106, 199].

### 13. 8. Extraction de membrane externe

Après induction selon les conditions définies précédemment, les cellules provenant de culture de 250 ml ont été centrifugées. Les culots cellulaires ont été lavés avec du tampon A (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl). Après 30 min d'incubation dans la glace, les cellules ont été lysées par sonication et centrifugées à 10000 xg pendant 20 min à 4°C.

Les culots contenant les débris cellulaires sont mis à 20°C. Les surnageants (protéines cytoplasmiques solubles et protéines membranaires en suspension) ont été ultracentrifugés à 36000 rpm pendant 60 min à 4°C pour collecter les fractions membranaires.

Les culots de membranes ont été resuspendus dans 5 ml de tampon A contenant 2% Triton X-100 et 20 mM MgCl<sub>2</sub> final et incubé pendant 20 min à 4°C.

Après une ultracentrifugation 60 min à 4°C, les membranes ont été collectées. La fraction sédimentée a été resuspendue dans 5 ml de tampon de fixation (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazole) contenant 2% Triton X-100 et 5 mM EDTA pour solubiliser les membranes.

Après une nuit d'incubation à 4°C, le mélange a été ultracentrifugé comme précédemment, le surnageant contient la membrane externe solubilisée et le culot contient la membrane externe non solubilisée.

Vérifier l'extraction de membrane externe par SDS- PAGE [106, 199].

### 13. 9. Purification d'OmpEa 35- His Tag par Kit Ni-NTA

Certains vecteurs comporteront sur la provision d'un site de fixation d'un ribosome (RBS) et sur le codon de lancement de la traduction à l'intérieur du fragment cloné, alors que d'autres sont destinés à encoder une séquence fondue au terminus N de la protéine exprimée qui lui permettra d'être épurée facilement par une étape de fixation spécifique. L'exemple que l'on peut citer est celui de His-Tag, une série de résidus d'histidines, qui se fixera fortement à une colonne de chromatographie porteuse d'ions Ni<sup>2+</sup> [106, 197].

Ni-NTA Spin kits est une méthode simple pour une purification rapide de la protéine-6 His- tagged à partir de petites cultures, basée sur l'utilisation de résines Ni-NTA silice.

La grande affinité des résines Ni-NTA pour la protéine-6 His tagged est due à la spécificité d'interaction entre les résidus histidine et les ions nickel immobilisés.

Pour purifier OmpEa 35-6His d'*E.aerogenes*, les membranes de BL21 (DE3) pLysS (pET 24 a<sup>+</sup>/ompEa 35) ont été solubilisées de façon sélective en deux étapes. Le Triton X-100 utilisé à des concentrations de 0,5 à 2%, solubilise indifféremment les membranes interne et externe. En combinaison avec des Mgcl<sub>2</sub>, ce détergent solubilise uniquement la membrane interne [106, 197].

Dans un premier temps, nous avons donc traité les membranes au triton X-100 (2% final) en présence de Mgcl<sub>2</sub> (20 mM final) pour éliminer les protéines de membrane interne. Dans un second temps, les vésicules de membrane externe ont été collectées et incubées dans du Triton X-100 (2% final) en présence d'EDTA (5 mM final) pendant une nuit à 4°C.

En chélatant les ions Mg<sup>+2</sup>, l'EDTA annule leur effet protecteur sur la solubilisation de la membrane externe par le Triton X-100 [106, 197].

Après une nouvelle ultracentrifugation du mélange, le surnageant contient les protéines de membrane externe solubilisées.

### 13. 9. 1. Réactifs utilisés

- tampon de lyse (5 mM imidazole)
- tampon de lavage (20 mM imidazole)
- tampon d'élution (250 mM imidazole)

### 13. 9. 2. Protocole

- Equilibrer deux colonnes Ni-NTA avec 600 µl de tampon de lyse
- Centrifuger 2 min à 700 xg ( ~ 200 rpm)
- Charger les deux colonnes avec 600 µl du surnageant de membrane externe
- Centrifuger 2 min à 700 xg ( ~ 200 rpm)
- Récupérer le liquide collecté ( lysat ) pour l'analyser par SDS-PAGE
- 1<sup>er</sup> lavage : 600 µl du tampon de lavage
- Centrifuger 2 min à 700 xg ( ~ 200 rpm)
- Récupérer le liquide collecté du 1<sup>er</sup> lavage pour l'analyser par SDS-PAGE
- 2<sup>ème</sup> lavage : 600 µl du tampon de lavage
- Centrifuger 2 min à 700 xg ( ~ 200 rpm)

- Elution : 600 µl du tampon d'élution
- Centrifuger 2 min à 700 xg ( ~ 200 rpm)
- 2<sup>ème</sup> élution : : 600 µl du tampon d'élution
- Centrifuger 2 min à 700 xg ( ~ 200 rpm)
- Récupérer le 2<sup>ème</sup> éluat pour l'analyser par SDS-PAGE

La protéine épurée est conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

## 14. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

Un gel de polyacrylamide en présence de SDS séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, sous l'effet d'un champ électrique. Les échantillons sont déposés sur un gel coulé entre deux plaques de verre.

### 14. 1. Préparation

- Des précultures en LB sont effectuées la veille . Les culots cellulaires sont repris dans 100 µl de tampon de dénaturation TS-TD : tampon simple (TS) [200 mM Tris-Hcl (pH 8,8), 5 mM EDTA, 1M saccharose et 0,01% bleu de bromophénol] tampon dénaturant (TD) [18% SDS, 0,3 M dithiothréitol, 5% β-mercaptophenol]) pour un équivalent DO de 1 (ou 50 µl pour DO= 0,5).

Les échantillons ainsi préparés sont ensuite chauffés, une température de 96°C permettant la dissociation complète de la structure trimérique de la porine en monomère, puis vortexer.

Préparer les gels de migration (running) et de concentration (stacking) selon la recette standard.

#### Composition du gel de séparation ou gel inférieur :

- Acryl 30/08.....3,00 ml
- Tris 3M pH 8,8 .....1,20 ml
- Sucrose 66%.....1,03 ml
- H<sub>2</sub>O.....3,60 ml

Dégazer

- SDS 10%.....90 µl
- APS 10%.....45 µl
- Teemed 10%.....45 µl

Dès que le gel est solidifié, un peigne est enfilé entre les deux plaques de verre, dans l'espace laissé dans la partie supérieure. On coule alors un gel de concentration (stacking) de composition suivante :

Composition du gel de concentration ou gel supérieur :

- Acryl 30/08.....375 µl
- Tris 1M pH 6,8.....468 µl
- Sucrose 66%.....480 µl
- H<sub>2</sub>O..... 2,31 ml

Dégazer

- SDS 10%.....37,5 µl
- Tris 10%.....40,0 µl
- Teemed 10%.....60,0 µl

Les plaques et leur support sont placés dans un appareil à fiches réservant en son centre l'espace rempli de tampon de migration.

Composition du tampon de migration :

- SDS..... 2 g
- Tris..... 6 g
- Glycine.....28 g
- H<sub>2</sub>O..... 2 litres

## 14. 2. Migration

- « Faire le montage, remplir de tampon de migration (haut) et charger les puits avec 2 µl d'échantillon et 1,5 de gamme.
- Après avoir chargé les puits avec une quantité déterminée d'échantillons, l'ensemble est positionné dans une cuve Bio Rad. La migration s'effectue sous un voltage de 160 V.
- La migration est terminée quand le bleu est entièrement sortie du gel .
- Quand les dépôts atteignent le bas du gel, celui ci est récupéré pour être coloré.

### **14. 3. Coloration des gels au bleu**

A la fin de la migration, après avoir marqué le haut gauche du gel et enlevé le stacking, on l'incube dans le bleu de Coomassie sous agitation pendant 1h. Après 3 lavages sous agitation avec le décolorant, on lave ue fois dans l'acide acétique pour fixer le bleu pendant 15 min. On fait sécher le gel sur papier Watman.

**RESULTATS**  
**ET**  
**INTERPRETATIONS**

## 1. EXAMENS MICROSCOPIQUES

Les observations microscopiques des différentes souches étudiées d'*Enterobacter aerogenes* se présentent sous forme de bacilles isolés, plus ou moins fins, mobiles à Gram négatif.

## 2. CARACTERES CULTURAUX

- ↳ **Milieu solide** : toutes les souches d'*Enterobacter aerogenes* se sont développées sur milieu Luria Bertani (LB agar). Les colonies sont de couleur crème beige, bombées, légèrement muqueuses, à bord régulier, d'un diamètre de 2 à 3 mm.
- ↳ **Milieu liquide** : la culture en milieu LB liquide se manifeste par un trouble plus ou moins dense ; un précipité ou un dépôt au fond du tube est visible surtout après agitation du milieu.

## 3. CARACTERES BIOCHIMIQUES

**Tableau 7** : Caractères biochimiques d'*E. aerogenes* selon le système API 20 E

Tests effectués	Pourcentage de tests positifs	Pourcentage de tests négatifs
ONPG	98	2
ADH	0	100
LDC	98	2
ODC	98	2
Citrate	60	40
Nitrate réductase	100	0
H <sub>2</sub> S	0	100
URE	2	98
TDA	0	100
IND	0	100
VP	73	27
GEL	0	100
Glucose	99	1
Mannitol	99	1
Inositol	93	7
Sorbitol	99	1
Rhamnose	93	7
Saccharase	99	1
Mélibiose	98	1
Amygdaline	100	0
Arabinose	100	0

L'identification biochimique par le système API 20 E, révèle que toutes les souches d'*Enterobacter aerogenes* possèdent une  $\beta$ -galactosidase, réduisent les nitrates en nitrites par possession d'une nitrate réductase et possèdent également une lysine décarboxylase et une ornithine décarboxylase. Elles fermentent de nombreux substrats glucidiques (saccharose, mélibiose, arabinose, raffinose, rhamnose...) avec production de gaz.

Il faut noter que la lecture des résultats a été faite après 24 heures puis 48 heures d'incubation pour confirmer un résultat négatif.

#### 4. TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

**Tableau 8** : CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des différentes souches d'*E aerogenes* et de la souche de référence ATCC 13048.

Antibiotiques Souches	Imipénème	Céfépime	Céftazidime	Norfloxacine	Tétracycline
Ea 3	4	64	>512	256	8
Ea 5	4	64	>512	128	4
Ea 19	4	64	>512	256	4
Ea 27	8	64	>512	256	16
Ea I 320	32	64	>128	16	16
Ea C50249	8	256	512	256	16
ATCC 13048	1	1	1	0,5	2

Les valeurs des CMI obtenues avec les différentes souches étudiées sont particulièrement élevées pour le céfépime ( $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ ) et pour la céftazidime ( $\geq 512 \mu\text{g/ml}$ ) par rapport aux concentrations critiques données par la littérature ; la résistance observée est essentiellement due à la production d'une  $\beta$ -lactamase (TEM-24).

Seul l'imipénème reste actif sur les souche Ea3, Ea5 et Ea19 ( $4 \mu\text{g/ml}$ ). Ce carbapénème n'est pas hydrolysé par les  $\beta$ -lactamases et semble choisir une autre voie de pénétration autre que celle des porines. Inversement, les souches Ea27, Ea I320 et Ea C50249 sont résistantes à cet antibiotique ( $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ).

Les CMI obtenues pour la tétracycline sont particulièrement élevées pour les souches Ea27, EaI320 et EaC50249 : ( $16 \mu\text{g/ml}$ ). Cette résistance est due à un défaut de porine (les souches Ea 27 et Ea I320 sont dépourvues de porines) associé peut être à un mécanisme connu d'efflux pour cette molécule.

Une fluoroquinolone a également été testée, la norfloxacine connue pour passer essentiellement par les porines (Chevalier et al. 1999) [32], mais aussi par la voie lipidique, les CMI obtenues pour la norfloxacine sont élevées ( $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ ). Ce haut niveau de résistance surtout pour les souches Ea3, Ea27 et Ea C50249 ( $256 \mu\text{g/ml}$ ) est lié principalement à un défaut de porines accompagné soit par une mutation fréquente de la gyrase chez les souches cliniques, soit par un système d'efflux décrit récemment en clinique.

## 5- PROFIL D'EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

Piste 1 2



Piste 1, 2: ADN ATCC 13048

**Figure 28:** Profil de l'ADN génomique de la souche ATCC 13048.

Le résultat donné dans la **figure 28**, montre une bande intense correspondant à l'ADN chromosomique de la souche ATCC 13048.

## 6. AMPLIFICATION PAR PCR

L'amplification par PCR sur l'ADN de la souche ATCC 13048 a été réalisée à l'aide du couple d'amorces B et 2, choisie dans les zones homologues du gène de porine ompK 35 de *K. pneumoniae*, espèce proche d'*E. aerogenes*.

Piste 1 2 3



Piste 1 : marqueur VI

Piste 2, 3 : ADN amplifié par B et 2.

← 650 pb

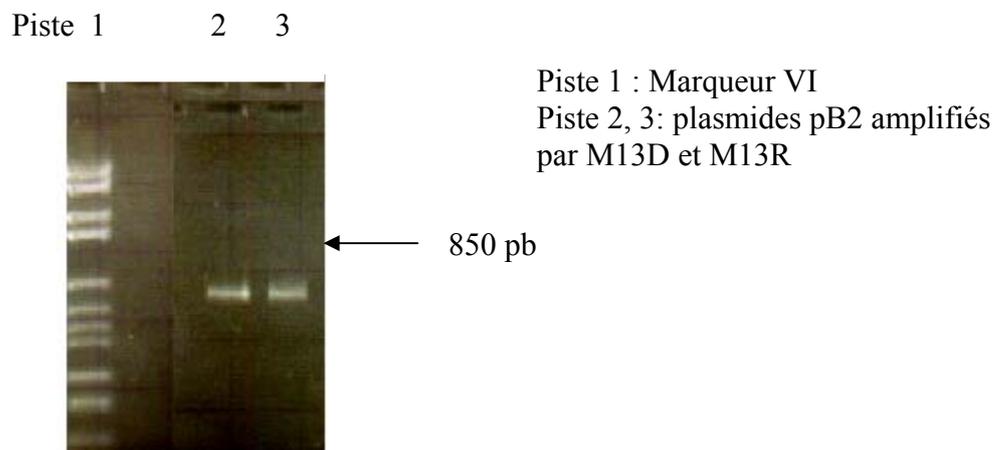
**Figure 29 :** PCR réalisée sur l'ADN ATCC 13048

Nous pouvons observer sur la **figure 29**, plusieurs bandes aux environs de 650 pb. Ces fragments ont été séquencés, alignés et étudiés avec une banque de données (Genbank.)

Les produits de PCR amplifiés par les amorces B et 2 ont montré des similitudes avec le gène ompK 35.

## 7. CLONAGE

L'amplification par PCR réalisée sur le plasmide pB2 (issu du clonage du produit de PCR amplifié avec les amorces B et 2 avec le pGEM-T) avec les amorces du plasmide (M13D et M13R) donne des produits d'amplification d'environ 850 pb sur les plasmides pB2 (obtenus à l'aide des amorces B et 2) (**Figure 30**).



**Figure 30:** PCR réalisée sur les plasmides pB2

Ces produits de PCR ont été séquencés avec les mêmes amorces qui ont servi à l'amplification (M13D et M13R). Les séquences obtenues sont ensuite comparées avec la banque de données (Genbank). On confirme l'homologie de l'insert contenu dans le plasmide pB2 avec la séquence du gène ompK 35 déjà connue dans la banque de données (86 % d'homologie sur 426 pb).

## 8. GNOME WALKER

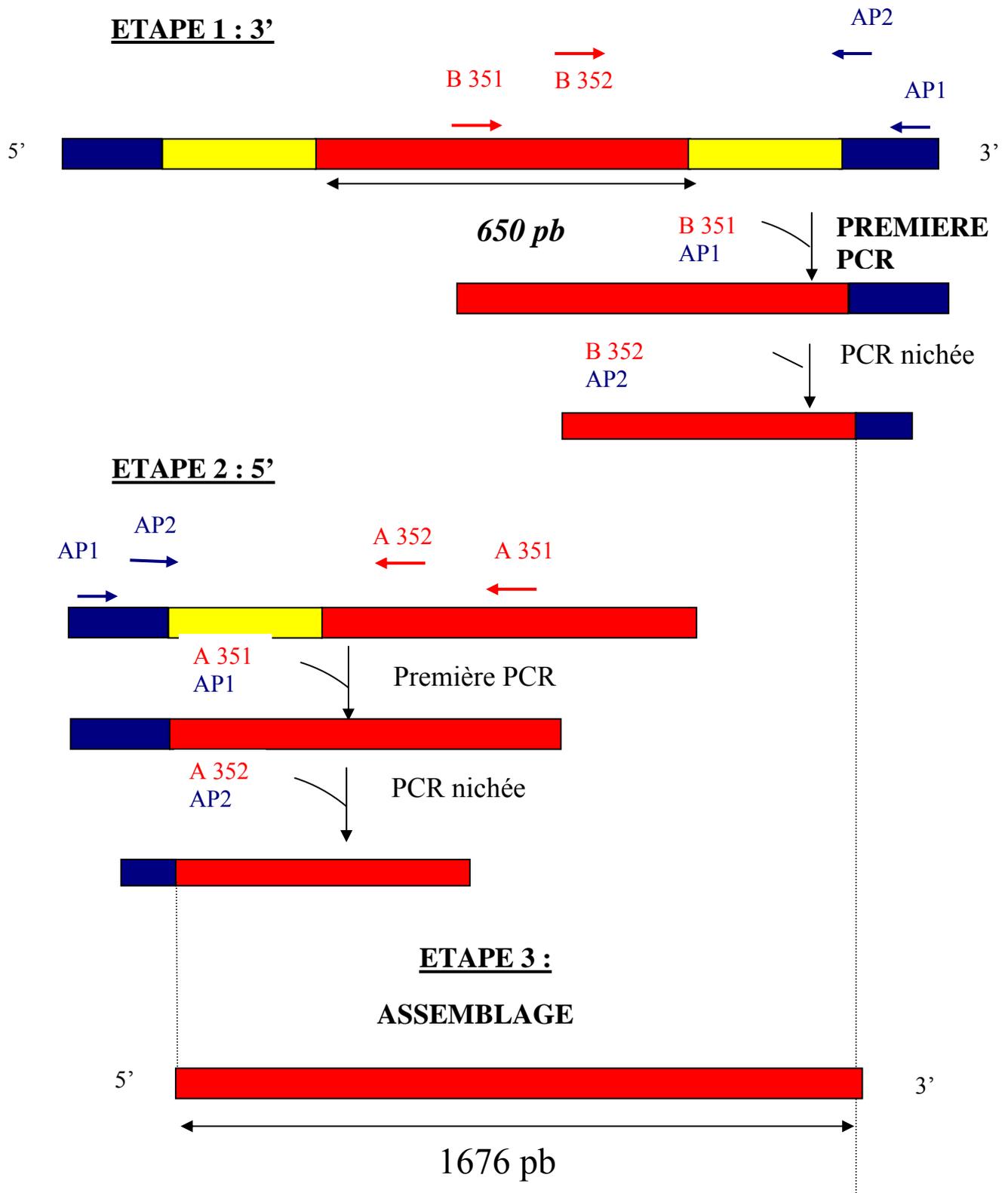
Les séquences des fragments peptidiques obtenues montrent une très forte similitude avec la porine OmpK 35. La séquence partielle de 650 pb a été alignée avec la séquence de OmpK 35, elle est plus courte des deux extrémités 3' et 5'. Les **figures 31 et 32** illustrent le principe du Genome Walker.

## PROGRESSION SUR LE GENOME



**Figure 31:** Principe du Genome Walker

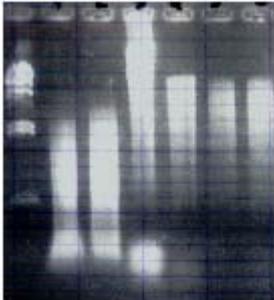
## GENOME WALKER



**Figure 32:** Suite du principe du Genome Walker

La figure que nous représentons ci-dessous montre le profil de la digestion enzymatique de l'ADN génomique ATCC 13048 par les six enzymes de restriction Alu I, Dra I, EcoR I, Nru I, Pvu II et Stu I.

Piste 1 2 3 4 5 6 7

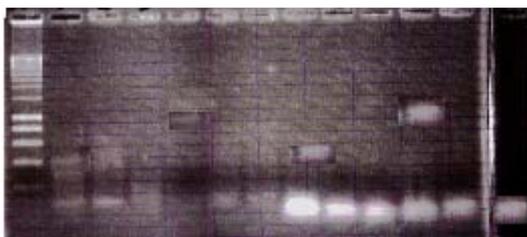


Piste 1 : Marqueur II  
 Piste 2 : ADN digéré par Alu I  
 Piste 3 : ADN digéré par Dra I  
 Piste 4 : ADN digéré par EcoR I  
 Piste 5 : ADN digéré par Nru I  
 Piste 6 : ADN digéré par Pvu II  
 Piste 7 : ADN digéré par Stu I

**Figure 33:** Profil de digestion enzymatique de l'ADN ATCC 13048

Après digestion enzymatique puis ligation avec l'adaptateur Genome Walker, l'ADN ATCC 13048 est amplifié par PCR, d'abord une PCR primaire à l'aide des couples d'amorces B<sub>351</sub>/ AP<sub>1</sub> du côté 3' et A<sub>351</sub>/ AP<sub>2</sub> du côté 5', suivie d'une PCR secondaire (PCR nichée) à l'aide des couples d'amorces B<sub>352</sub>/ AP<sub>2</sub> du côté 3' et A<sub>352</sub>/ AP<sub>2</sub> du côté 5'.

Piste 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Piste 1 : Marqueur Smart leader  
 Piste 2 : ADN ATCC digéré par Alu I, PCR I<sup>aire</sup>, Piste 8 : PCR II<sup>aire</sup>  
 Piste 3 : ADN ATCC digéré par Dra I, PCR I<sup>aire</sup>, Piste 9 : PCR II<sup>aire</sup>  
 Piste 4 : ADN ATCC digéré par EcoR I, PCR I<sup>aire</sup>, Piste 10 : PCR II<sup>aire</sup>  
 Piste 5 : ADN ATCC digéré par Nru I, PCR I<sup>aire</sup>, Piste 11 : PCR II<sup>aire</sup>  
 Piste 6 : ADN ATCC digéré par Pvu II, PCR I<sup>aire</sup>, Piste 12 : PCR II<sup>aire</sup>  
 Piste 7 : ADN ATCC digéré par Stu I, PCR I<sup>aire</sup>, Piste 13 : PCR II<sup>aire</sup>

**Figure 34:** PCR I<sup>aire</sup> et II<sup>aire</sup> du Genome Walker avec les amorces B<sub>351</sub>/ AP<sub>1</sub> et B<sub>352</sub>/ AP<sub>2</sub>

Dans la **figure 34**, nous représentons les produits d'amplification issus d'une PCR primaire et secondaire du Genome Walker utilisant les couples d'amorces B<sub>351</sub>/ AP<sub>1</sub> et B<sub>352</sub>/ AP<sub>2</sub>. L'amplification lors de la PCR primaire est très faible, nous observons deux très faibles bandes, l'une en piste 2 correspondant à l'ADN digéré par Alu I aux environs de plus de 500 pb et l'autre en piste 5 correspondant à l'ADN digéré par Nru I aux environs de 1000 pb. Lors de la PCR secondaire, l'amplification est nettement meilleure de sorte que nous observons deux bandes distinctes pour les pistes 8 et 11 où la digestion a été réalisée respectivement par Alu I et Nru I, en fait il s'agit des deux bandes observées lors de la PCR I<sup>aire</sup> qui se sont intensifiées au cours de la PCR nichée .

## 9. SEQUENÇAGE

Les deux produits de la PCR secondaire (nichée) sur l'ADN ATCC 13048 digérés respectivement par Alu I et Nru I ont alors été clonés dans le plasmide pGEM-T. Les plasmides extraits ont été séquencés à l'aide des amorces universelles T7, SP6 ainsi que les amorces internes (A<sub>351</sub>, A<sub>351</sub>, B<sub>351</sub>, B<sub>352</sub>) .

Un traitement bioinformatique a été réalisé. La **figure 35** montre le résultat du Blast pour la recherche d'homologie et l'alignement de séquences. La séquence obtenue est comparée à différentes séquences existantes dans la banque de données (Genbank). Le résultat est donné du score le plus élevé au plus faible avec évidemment le pourcentage d'homologie du plus élevé au plus faible; 88 % avec ompK 35 de *Klebsiella pneumoniae* .

La **figure 36 a**, montre la séquence en base azotées du gène ompEa 35 de la souche de référence d'*E.aerogenes* ATCC 13048, assemblée et alignée à l'aide du logiciel Autoassembler (Appelied Biosystems, Perkin, USA ). La séquence totale du gène putatif analogue à ompK 35 chez *E. aerogenes* est de 1671 pb.

A l'aide du programme de traduction translate([www.translateexpasy](http://www.translateexpasy)), nous avons pu traduire la séquence en acides aminés (**Figure 36 b**).

## 10. ALIGNEMENT DE SEQUENCES

La **figure 37**, montre l'alignement en acides aminés des gènes ompEa 35 chez *E. aerogenes*, ompK 35 chez *K. pneumoniae* et le gène modèle ompF chez *E.coli*.

L'alignement permet de déterminer les différentes structures de la protéine : feuilletts  $\alpha$ , les 16 feuilletts  $\beta$ , les huit loupes ou boucles...Cet alignement permet également d'identifier les différences qui peuvent exister par rapport aux autres gènes ompK 35 et omp F. Nous observons que les boucles L1, L2 et L6 sont plus courtes de 3 à 5 acides aminés, par contre les boucles L7 et L8 sont plus grandes de 3 à 5 acides aminés









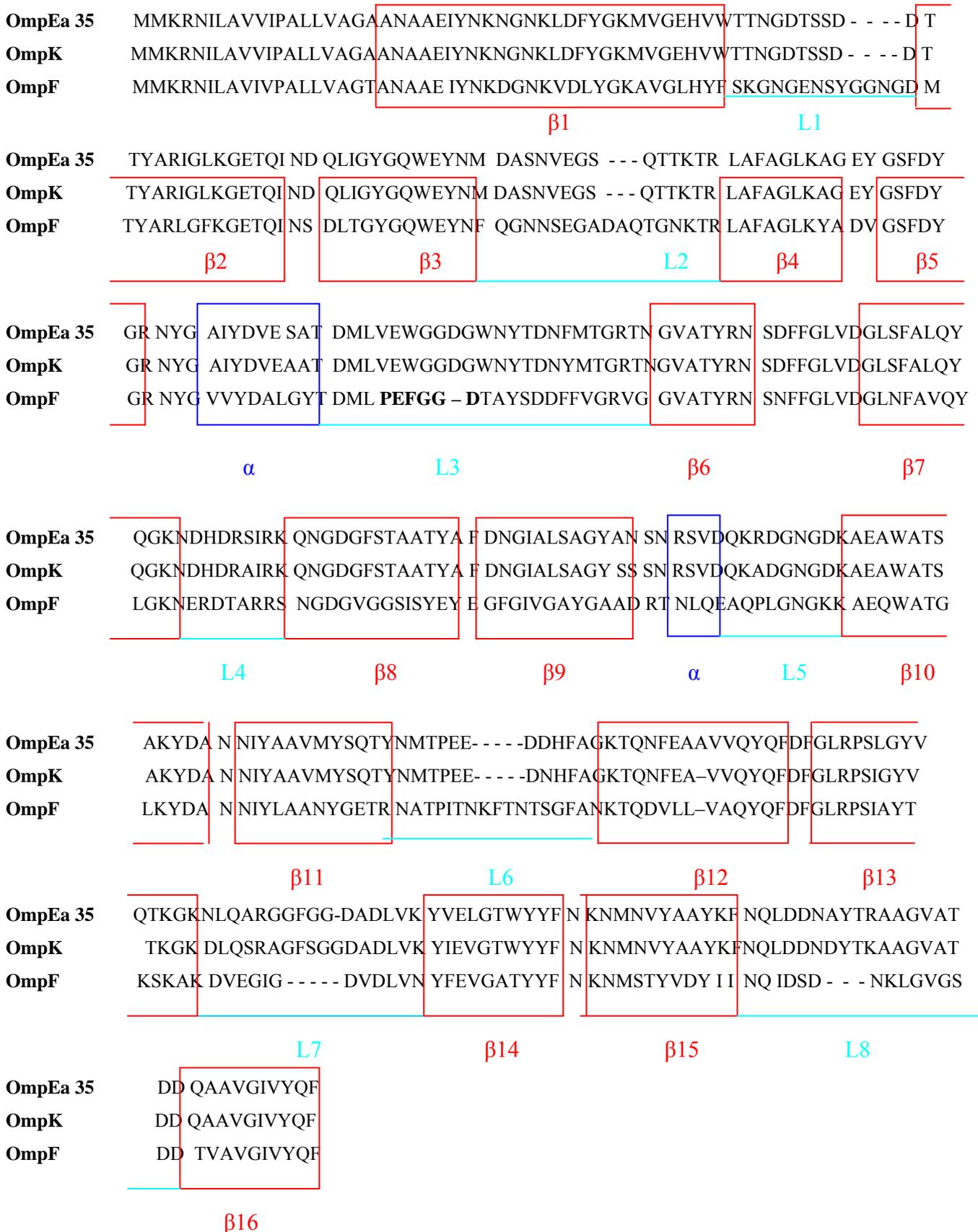


ATGAGAAGGTGACAATCTTCGCAAAGTGGAACGAATTTTGATTTTGATTGAGTTCACAAAGTTCCAAA  
 AAATACATATTTAGTTACATGTTTTTTCTTTTAGTAACCAATTTACGATATTGGTAGCATTTCGGGCTA  
 GCGAAACGGCACTACCGATGGAAAGATGCCTTCAGACACCAAATCTTCAATAGTTCTGTAAATTT  
 TCATTGACGGAAATTATTGCTGGCGGTGGAAGTGTATATAAAAAATATTAATGAGGGTAATAAATAA  
**TGATGA**AAGCGCAATATTCTGGCAGTGGTGATCCCTGCCCTGCTGGTAGCGGCCAACGCTGCGGAAAT  
 CTATAACAAAAATGGTAACAACTGGATTTCTACGGAAAAATGGTTGGCGAACATGTCTGGACCACC  
 AATGGTGACACCCAGCGACGACACCATATGCCCGTATCGGCCTGAAAGGCGAAACCCAGATCAACGA  
 CCAGTTGATCGGTTACGGCCAGTGGGAATACAACATGGATGCCGTCCAACGTTGAAGGTTCCCAGACC  
 ACCAAAACCCGTCTGGCTTTCGCCGGTCTGAAAGCGGGTGAATACGGTTCATTGATTATGGCCGTAA  
 CTACGGCGCCATCTACGACGTTGAATCCGCAACCGATATGCTGGTTGAGTGGGGCGGGCAGCGGCTGG  
 AACTACACCGATAACTTCATGACCGGCCGTACCAACGGCGTGGCCACCTACCGTAACTCAGACTTCTT  
 CGGTCTGGTGGACGGCCTGAGCTTTGCGCTGCAGTATCAGGGTAAAAACGATCACGACCGCTCAATTC  
 GCAAACAGAATGGCGACGGTTTCAGCACCGCGGCAACCTACGCGTTTGATAACGGTATCGCGCTGTCT  
 GCAGGTTACGCTAACTCCAACCGTAGCGTTGACCAGAAACGTGACGGCAACCGGTGACAAAGCTGAA  
 GCATGGGCAACCTCTGCCAAGTACGATGCTAACAACATCTATGCCCGAGTTATGTACTCCCAGACTTA  
 CAACATGACGCCGGAAGAAGATGACCACTTCGCGGGCAAACTCAGAACTTCGAAGCAGCCGTAGTT  
 CAATACCAGTTCGATTTCCGTCTGCGTCCGTCCCTGGGCTACGTGCAGACTAAAGGTAAAAACCTGCA  
 GGCTCGCGGTGGCTTCGGCGGCGATGCGGACCTGGTTAAATACGTAGAACTGGGTACCTGGTACTACT  
 TCAACAAAAACATGAACGTGTACGCGGCGTACAAGTTCAACCAACTGGATGATAATGCCTACACTCG  
 CGCAGCTGGCGTAGCCACCGACGACCAGGCTGCGGTTGGTATCGTTTACCAGTTCTAATCTGTAGTAC  
 ACCCCTTCGTGATATGCCTAAAAAGCAGGACTTCGGTCCCTGCTTTTCTGCGTTACTAAGACGAAGATC  
 GTAACCTTGCAAAAACCTTCTCGCTTTTTGTGCGCAAACGGTTGGCAATTTGTAAATCCTACCGTTACCCT  
 GATAGCGGATTTCCCTCAGTAATCACAAGGAACCTCGTCATGTTTGAGAACATTACCCGCGCAA

**Figure 36 a :** Séquence en bases azotées d'ompEa 35

**Met** ERCLQTPNYLQ **Stop** FCKFSLTEIIAGGGKCSYKKY **Stop Stop** G **Stop Stop**  
**Met Met** KRNILAVVIPALLVAGAAEIYNKNGNKLDFY GK **Met** VGEHVWT  
 TNGDTSDDTTYARIGLKGETQINDQLIGYGQWEYN **Met** DASNVEGSQ  
 TTKTRLAFAGLKAGEYGSFDYGRNYGAIYDVESATD **Met** LVEWGGDG  
 WNYTDNF **Met** TGR TNGVATYRNSDFFLVDGLSFALQYQGKNDHRS  
 IRKQNGDGFSTAATYAFDNGIALSAGYANSNRSVDQKRDGNGDKAE  
 AWATSAKYDANNIYAAV **Met** YSQTYN **Met** TPEEDDHFAGKTQNFEAA  
 VVQYQFDFGLRPSLGYVQTKGKNLQARGGFGGDADLVKYVELGTW  
 YYFNKN **Met** NVYAAAYAA YKFNQLDDNAYTRAAGVATDDQAAVGIVY  
 QF **Stop**

**Figure 36 b:** Séquence en acides aminés de OmpEa 35



**Figure 37:** Aligment en acides amines des gènes ompEa 35, ompK 35 et ompF

Au niveau de la zone L3, le motif PEFGGD est différent chez ompEa 35 et ompK 35 par rapport au modèle omp F. En effet, on remarque la substitution de la proline par la valine et du phénylalanine par le tryptophane .

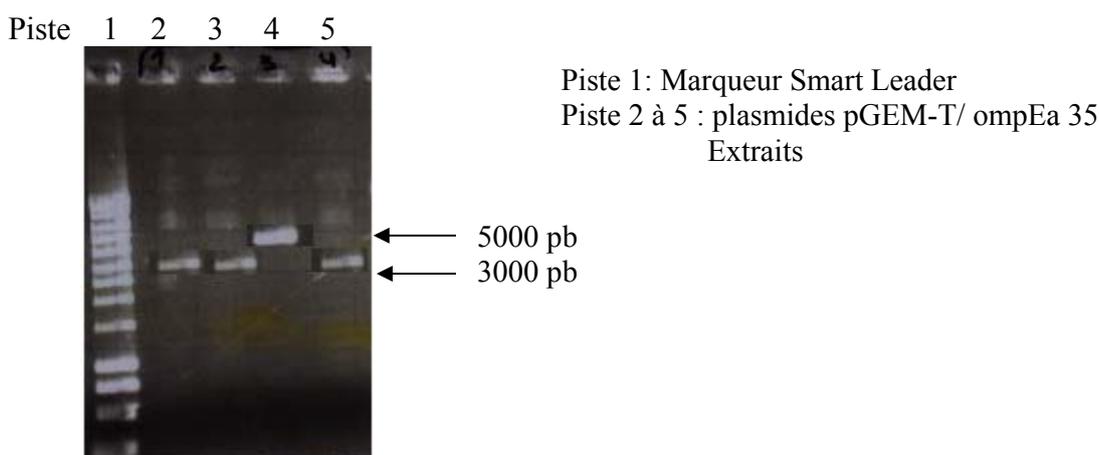
## 11. DETERMINATION DE LA CARTE DE RESTRICTION

La **figure 38** (voir annexe), montre la carte de restriction du gène putatif ompEa 35 où les enzymes de restriction sont triés des plus rares aux plus fréquents, c'est à dire de ceux qui ont un seul site de restriction tel que l'enzyme Kpn I en position 1324 qui reconnaît la séquence CCTGGT, à ceux qui ont plusieurs sites de restriction tel que Cvi T I qui à 22 sites en différentes positions : 38, 44, 240, 428, 437, 564 .....1416.

La connaissance de la carte de restriction du gène est primordiale en génie - génétique pour une utilisation ultérieure, c'est le cas dans notre travail lors de l'utilisation du site Sal I pour la ligation avec la cassette kanamycine (voir méthodes 11. 1. 2).

## 12. ROLE DE LA PORINE OmpEa 35 DANS LE RETOUR A LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

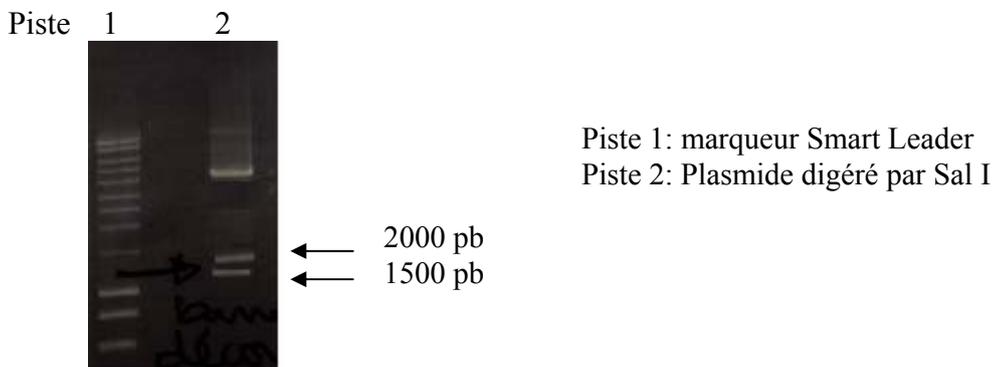
### 12. 1. La porine OmpEa 35 sous le contrôle de son promoteur



**Figure 39:** Profil d'extraction des plasmides recombinants pGEM-T/ ompEa 35

La **figure 39**, montre le profil d'extraction des plasmides recombinants pGEM-T/ ompEa 35 par le kit « Wizard Plus SV Minipreps » de 4 clones après transformation dans *E.coli* JM109. Nous observons des bandes en piste 2, 3 et 5 aux environs de 3000 pb (taille du vecteur pGEM-T). Le clone en piste 4 semble être intéressant, nous supposons qu'il contient notre insert vu la taille de la bande qui correspond à un fragment d'environ 5000 pb; la taille attendue (le vecteur fait 3003 pb associé au gène ompEa 35 qui fait 1671 pb).

Le plasmide recombinant (supposé contenir l'insert, en **piste 4, figure 39**) est digéré par Sal I; un seul site de restriction en position 31, reconnaissant la séquence GTCCAC et en position 75 au niveau de vecteur pGEM -T. Le profil de la digestion étant représenté dans la **figure 40**.



**Figure 40:** Profil de la digestion enzymatique par Sal I

Dans la figure ci-dessus, nous observons en piste 2, trois bandes, l'une aux environs d'un peu plus de 1500 pb, une deuxième aux environs de 2000 pb, la troisième bande plus haute et donc plus lourde représente une forme surenroulée du plasmide, c'est logique parce que le plasmide recombinant a été coupé à deux niveaux ( une fois au niveau de l'insert et une autre fois au niveau du vecteur).

Après la digestion, le plasmide recombinant est ligué avec une cassette kanamycine puis transformé dans les souches d'*E. aerogenes* 289 et *E. cloacae* RM3 pour tester la sensibilité de ces dernières aux différents antibiotiques utilisés en présence et en absence de la porine 35.

Le tableau 9 indique les CMI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) obtenues pour les deux souches *E. aerogenes* 289 et *E. cloacae* RM3 en absence et en présence de la porine OmpEa 35.

**Tableau 9** : CMI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) obtenues pour les souches *E. aerogenes* 289 et *E. cloacae* RM3 avec ou sans la porine ompEa 35.

Antibiotiques Souches	Antibiotiques				
	Imipénème	Céftazidime	Céfotaxime	Céfépime	Norfloxacine
Ea 289	2	>512	128	32	256
Ea 289+ Omp 35	1	>512	256	32	256
RM3	4	>512	>512	32	8
RM3+ Omp 35	4	>512	512	16	0,5

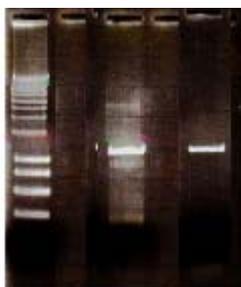
+ Omp35: *E. aerogenes* en présence de la porine OmpEa 35.

Les valeurs de CMI indiquées dans ce tableau ne révèlent pas de différences significatives en présence ou en absence de la porine OmpEa 35 sauf pour la norfloxacine chez la souche RM3, qui est sûrement dûe à un mécanisme d'efflux très actif déjà connu chez cette souche. *A priori*, soit la porine n'est pas fonctionnelle et n'a aucun rôle dans la restauration de la sensibilité aux antibiotiques, soit elle n'est pas exprimée parce qu'il y a un système de régulation qui réprime le promoteur de la porine.

Dans le but d'éclaircir ce conflit, la porine OmpEa 35 a été soumise au contrôle d'un autre promoteur; le promoteur lacZ.

## 12. 2. La porine OmpEa 35 sous le contrôle du promoteur lac Z

Piste 1 2 3 4 5



← 1,1 kb

Piste 1: Marqueur Smart Leader

Piste 2 : amplification avec les amorces TP<sub>351</sub> /T<sub>352</sub>

Piste 3 : amplification avec les amorces TP<sub>352</sub> /T<sub>354</sub>

Piste 4 : amplification avec les amorces TP<sub>352</sub> /T<sub>352</sub>

Piste 5 : amplification avec les amorces TP<sub>352</sub> /T<sub>354</sub>

**Figure 41**: Amplification par PCR de la séquence du gène ompEa 35 sans le promoteur.

La **figure 41**, montre l'amplification par PCR du gène putatif ompEa 35 à l'aide des couples d'amorces TP<sub>351</sub> / T<sub>352</sub>, TP<sub>351</sub> / T<sub>354</sub>, TP<sub>352</sub> / T<sub>352</sub> et TP<sub>352</sub> / T<sub>354</sub>, de façon à amplifier la séquence du gène sans le promoteur pour qu'elle soit clonée dans le vecteur de clonage pDrive (QIAGEN).

L'amplification à l'aide des couples d'amorces TP<sub>351</sub> / T<sub>352</sub> et TP<sub>352</sub> / T<sub>352</sub> (piste 2 et 4) est négative. En pistes 3 et 5, l'amplification à l'aide des couples d'amorces TP<sub>351</sub> / T<sub>354</sub> et TP<sub>352</sub> / T<sub>354</sub> donne une bande aux environs de 1,1 kb.

Le produit de PCR issu de l'amplification à l'aide du couple d'amorce TP<sub>351</sub> / T<sub>354</sub> est ligué au vecteur pDrive puis transformé dans *E.coli* XLI Blue

Les plasmides recombinants pDrive/ompEa 35 ont été extraits par le kit « Wizard Plus SV Minipreps » est représentée dans la **figure 42**.

Piste 1 2 3 4



Piste 1 : Marqueur Smart Leader

Piste 2 à 4 : plasmides extraits

**Figure 42:** Profil d'extraction des plasmides pDrive/ ompEa 35

Pour vérifier si le gène ompEa 35 (sans promoteur) est inséré dans le vecteur pDrive, les plasmides extraits ont été analysés par digestion enzymatique par EcoR I

Piste 1 2 3 4



3.9 kb

1.2 kb

Piste 1: Marqueur Smart Leader

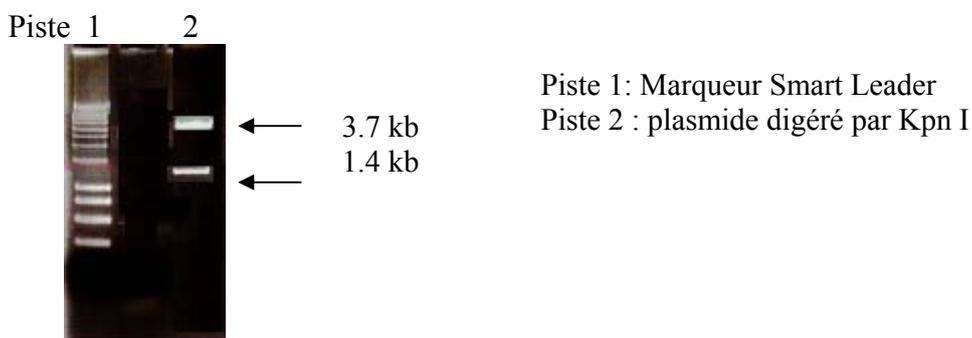
Piste 2 à 4 : plasmides digérés par EcoR I

**Figure 43:** profil de la digestion enzymatique par EcoR I

La **figure 43**, illustre le profil de la digestion enzymatique par EcoR I des trois plasmides pDrive/ompEa 35 extraits (**Figure 42**).

En piste 2, nous avons deux bandes, l'une aux environs de 1,2 kb et l'autre aux environs de 3,9 kb, *à priori* ce plasmide contient l'insert omp 35; le pDrive fait 3,85 kb et il contient deux sites EcoR I, parcontre il n'y a pas de site EcoR I sur l'insert ompEa 35. En piste 3 et 4, nous avons une bande aux environs de 3,9 kb, donc ça correspond au vecteur pDrive non digéré par EcoR I parce qu'apparemment il n'y a pas d'insert.

Il reste à voir donc si le plasmide recombinant (**piste 2, figure 42**) contient l'insert dans le bon sens, c'est à dire le même sens que le promoteur lac Z. Pour cela, ce plasmide est digéré par Kpn I.



**Figure 44:** Profil de la digestion enzymatique par KpnI

Dans la **figure 44**, est illustré l'analyse du plasmide recombinant par digestion enzymatique par Kpn I. Nous observons deux bandes, l'une aux environs de 1,4 kb et l'autre aux environs de 3,7 kb parce qu'il y a un site Kpn I en position 1324 sur l'insert ompEa 35 et un site KpnI en position 270 sur le vecteur. Il s'agit donc du bon plasmide.

Le plasmide recombinant (**piste2, figure 42**) est transformé dans la souche *E. aerogenes* 289. Le **tableau 10** indique les CMI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) obtenues pour la souche Ea 289 en absence et en présence de la porine ompEa 35.

**Tableau 10:** CMI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pour la souche *E. aerogenes* 289 avec ou sans la porine ompEa 35.

Antibiotiques Souches	Imipénème	Céftazidime	Ceftazidime + Ac. clav	Céfépime	Norfloxacine	Céfotaxine
Ea 289	2	> 512	> 512	32	256	128
Ea 289+ omp 35	0,5	128	256	2	64	32

+ omp 35 : en présence de la porine ompEa 35

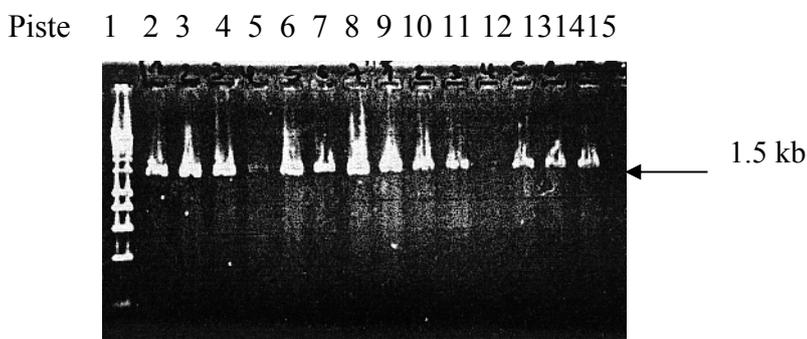
Ac. clav : acide clavulanique

En présence de la porine OmpEa 35, les CMI sont considérablement diminuées, en particulier pour le céfépime de 32 à 2 µg/ ml. Donc, nous pouvons conclure que la porine est fonctionnelle et est responsable de la restauration à la sensibilité aux antibiotiques.

La répression de la transcription de ompEa 35 est dûe à un mécanisme des répresseurs connus de la omp F analogue de la OmpEa 35 d'*E.aerogenes*.

### 13. ETUDE DES SEQUENCES DES GENES DE SOUCHES D'*E. aerogenes*

Une PCR réalisée à l'aide des couples amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub> et T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub> a été réalisée pour amplifier la séquence du gène de la porine ompEa 35 analogue à ompK 35 des six souches étudiées ainsi que la souche de référence d'*E. aerogenes* (**Figure 45**).



Piste 1 : Marqueur Smart Leader

Piste 2: ADN Ea 3 amplifié avec les amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub>

Piste 3 : ADN Ea 5 amplifié avec les amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub>

Piste 4 : ADN Ea 19 amplifié avec les amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub>

Piste 5 : ADN Ea 27 amplifié avec les amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub>

Piste 6 : ADN Ea I320 amplifié avec les amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub>

Piste 7 : ADN Ea C50249 amplifié avec les amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub>

Piste 8 : ADN ATCC 13048 amplifié avec les amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub>

Piste 9: ADN Ea 3 amplifié avec les amorces T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>

Piste 10 : ADN Ea 5 amplifié avec les amorces T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>

Piste 11 : ADN Ea 19 amplifié avec les amorces T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>

Piste 12 : ADN Ea 27 amplifié avec les amorces T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>

Piste 13 : ADN Ea I320 amplifié avec les amorces T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>

Piste 14 : ADN Ea C50249 amplifié avec les amorces T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>

Piste 15 : ADN ATCC 13048 amplifié avec les amorces T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>

**Figure 45:** Amplification par PCR de la séquence du gène ompEa 35 des souches d'*E. aerogenes*

Dans la **figure 45**, nous avons les produits d'amplification des différentes souches étudiées et de la souche de référence d'*E. aerogenes*, issus de l'amplification à l'aide des couples d'amorces T<sub>351</sub>/ T<sub>352</sub> et T<sub>353</sub>/ T<sub>354</sub>. L'amplification est légèrement faible pour l'ADN Ea 27 (piste 5 et 12) par rapport aux autres où elle est meilleure, les produits obtenus sont d'une taille approximative de 1,5 kb.

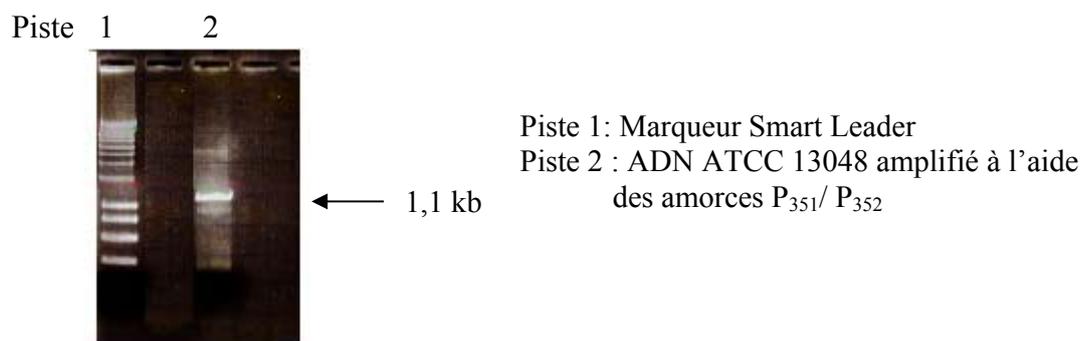
Ces produits de PCR ont été purifiés, séquencés et alignés. L'alignement de séquences des gènes analogues à ompK 35 sous forme de bases azotées des différentes souches d'*E. aerogenes* Ea 3, Ea 5, Ea 19, Ea 27, Ea I320 et Ea C50249 ainsi que de la souche de référence ATCC 13048 est illustré dans la **figure 46**.

Cet alignement permet d'identifier certaines mutations. Nous observons une variation dans les souches Ea3 et EaC50249. En effet, nous remarquons la substitution de la cytosine présente chez les autres souches par une thymidine et d'une guanine par une adénine chez la souche Ea C50249, ainsi que la substitution d'une cytosine par une adénine chez la souche Ea 3.

La **figure 47**, montre l'alignement de séquences des gènes ompK 35, ompF et des gènes analogues des deux souches Ea 3 et Ea C50249 sous forme de protéines. Nous avons noté 14 délétions, 10 insertions et plusieurs mutations par rapport à la séquence du gène modèle ompF.

## 14. SUREXPRESSON ET PURIFICATION DE LA PORINE OmpEa 35

### 14. 1. Amplification par PCR



**Figure 48** : Amplification de l'ADN ATCC 13048 à l'aide des amorces P<sub>351</sub>/ P<sub>352</sub>.

L'amplification par PCR ayant généré un fragment d'ADN de taille attendue, à savoir 1,1 kb pour ompEa 35. Le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pGEM-T. Cette étape préalable au clonage dans le vecteur d'expression permet de vérifier la séquence du produit d'amplification (absence de mutations, présence des sites de restriction Nde I et XhoI, et conservation des cadres ouverts de lecture au niveau des amorces).





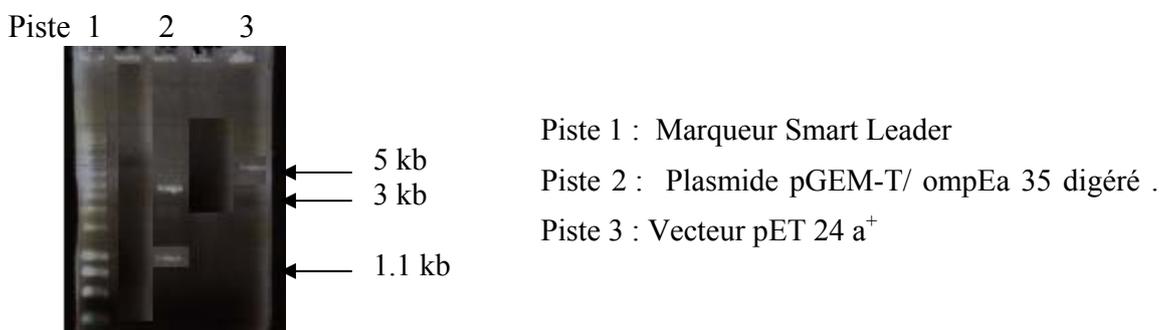




Après transformation de XL1- Blue avec le mélange pGEM-T /ompEa 35, quelques clones Amp<sup>R</sup> ont été analysés afin de vérifier la présence de l'insert. Les clones contenant ompEa 35 ont été soumis au séquençage. La séquence de l'insert ompEa 35 s'est avérée correcte .

## 14. 2. Digestion enzymatique par Nde I, Xho I

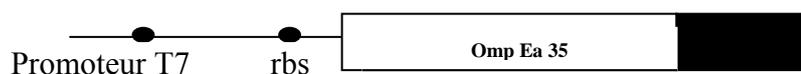
Avant clonage dans le vecteur d'expression, l'insert ompEa 35 ainsi que le vecteur pET 24 a<sup>+</sup> doivent être préparés par digestion enzymatique avec les enzymes Nde I et Xho I.



**Figure 49:** profil de la digestion enzymatique par Nde I, Xho I

Dans la **figure 49**, en piste 2 la digestion du plasmide recombinant pGEM-T/ ompEa 35, génère deux fragments l'un aux environs de 3 kb correspondant au vecteur pGEM-T et l'autre aux environs de 1.1 kb correspondant à ompEa 35. En piste 3, la digestion du vecteur d'expression pET 24 a<sup>+</sup> donne un fragment aux environs de 5 kb correspondant à la forme linéaire du vecteur. Les deux bandes correspondant respectivement à ompEa 35 et au vecteur pET 24 a<sup>+</sup>, ont été purifiées à partir du gel d'agarose avec le kit Concert Gel Extraction Systems, Gibco BRL .

Le fragment Nde I- Xho I contenant ompEa 35 a été sous-cloné entre les sites Nde I et Xho I du vecteur pET 24 a<sup>+</sup>. Les sites Nde I et Xho I ont été utilisés pour cloner ompEa 35 sous le contrôle du promoteur du phage T7 en aval d'un site de fixation des ribosomes (rbs).

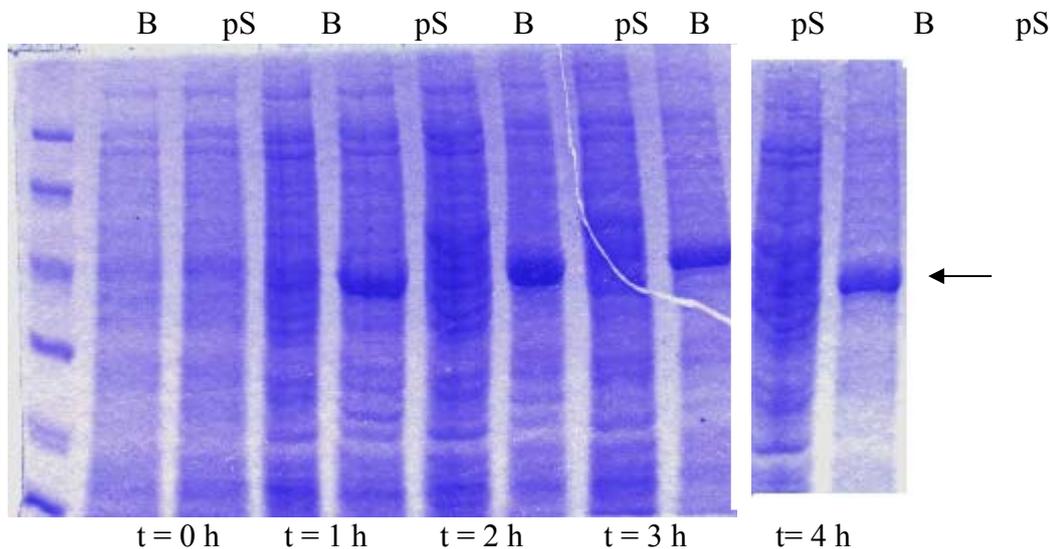


### 14. 3. Surproduction de la protéine membranaire chez *E.coli*

Dans le système T7, les souches d'expression utilisées sont lysogènes pour la phage  $\lambda$  DE3 qui porte le gène codant l'ARN polymérase T7. Cette enzyme transcrit sélectivement les gènes clonés en aval d'un promoteur T7. Le gène codant l'ARN polymérase T7 est sous le contrôle d'un promoteur lac UV5 inducible par l'IPTG, toutefois, en l'absence d'inducteur il existe une transcription basale à partir de ce promoteur.

Le plasmide p(pET 24a<sup>+</sup>/ ompEa 35) a été introduit dans deux souches d'*E.coli*: BL21 (DE3) et BL21 (DE3) pLysS qui sont sélectionnées pour la surproduction de protéines membranaires. Les gènes codant des protéines de membrane sont généralement toxiques pour les cellules si leur expression de base n'est pas suffisamment réprimée. En effet, la production de l'insertion de protéines surnuméraires dans les membranes perturbent leur stabilité. Les bactéries transformées peuvent avoir une croissance ralentie.

#### ➤ Obtention des extraits cellulaires totaux



B : BL21 (DE3)  
pS: BL21 (DE3) pLys S

Piste 1 : marqueur

Piste 2: extraits cellulaires totaux avant induction ; BL21 (DE3).

Piste 3: extraits cellulaires totaux avant induction ; BL21 (DE3) pLysS.

Piste 4: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3)

Piste 5: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3) pLysS

Piste 6: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3)

Piste 7: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3) pLysS

Piste 8: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3)

Piste 9: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3) pLysS

Piste 10: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3)

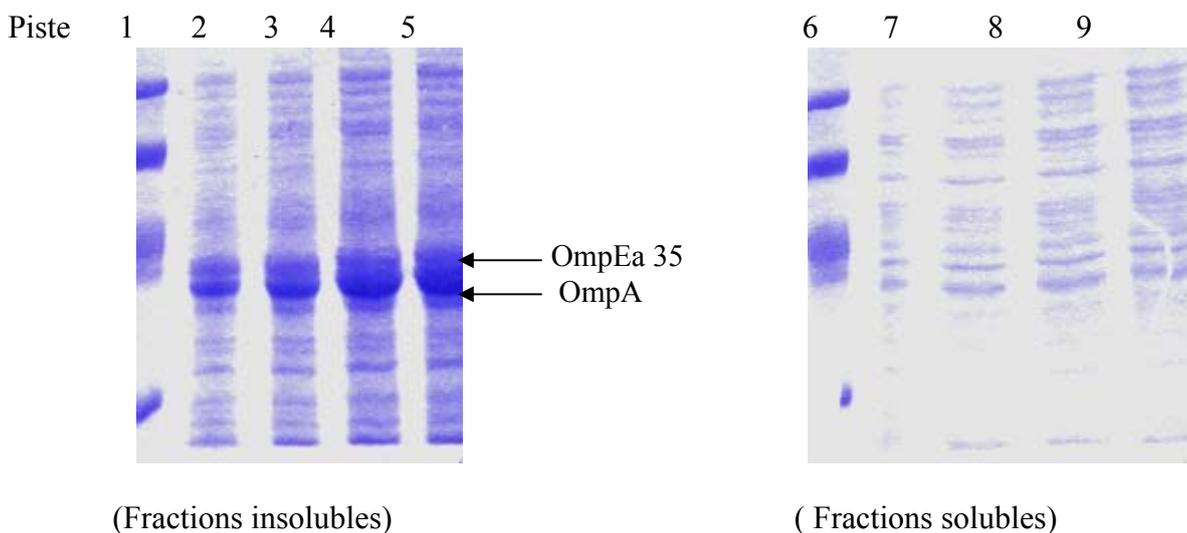
Piste 11: extraits cellulaires totaux après induction ; BL21 (DE3) pLysS

**Figure 50:** Production d'OmpEa 35 dans BL21 (DE3) et BL21 (DE3) pLysS.

Dans la **figure 50** est illustré l'analyse SDS-PAGE des extraits cellulaires totaux à partir de la BL21 (DE3) et la BL21 (DE3) pLysS transformées par pET 24 a<sup>+</sup>/ompEa 35 et qui ont été cultivées selon les conditions décrites dans Matériels et Méthodes [13. 5].

L'expression a été induite à t = 0 par l'addition d'IPTG. Les pistes 2 et 3 représentent les échantillons avant induction à l'IPTG, puis les pistes de 4 à 6, après induction à t = 1h, t = 2h, t = 3h et t = 4h. La protéine ompEa 35 est clairement surproduite dans les extraits de cellules induites. Nous remarquons qu'elle est plus surproduite dans la BL21 (DE3) pLysS qu'en BL21 (DE3). La présence de pLysS, en réduisant l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase T7 dans les cellules, semble favoriser l'expression de la protéine.

#### 14. 4. Préparation des fractions solubles et insolubles



Piste 1 : marqueur

Piste 2 à 5 : fractions solubles (2 µl, 5 µl, 8 µl et 10 µl).

Piste 6 à 9 : fractions insolubles (2 µl, 5 µl, 8 µl et 10 µl).

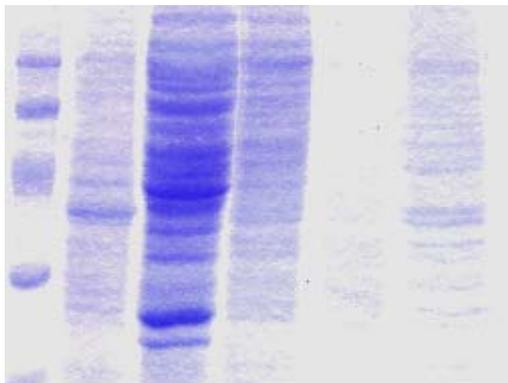
**Figure 51:** Analyse SDS-PAGE des fractions solubles et insolubles

Des échantillons de 2, 5, 8 et 10 µl des fractions protéiques solubles et insolubles ont été analysés par SDS - PAGE.

Sur les gels présentés dans la **figure 51**, nous avons deux protéines qui sont majoritairement surproduites. En fractions insolubles; la protéine OmpEa 35 – 6 His migrant aux alentours de 38 kda est bien produite. Seule une faible quantité est détectable en fractions solubles. La 2<sup>ème</sup> protéine en dessous, correspondant à ompA d'*E.coli*.

## 14. 5. Purification de OmpEa 35 - 6His par chromatographie d'affinité

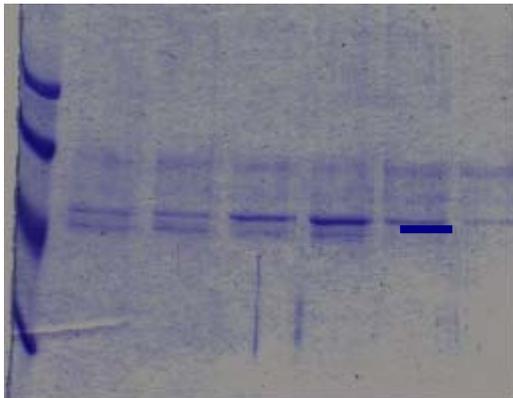
Piste 1    2    3    4    5    6



Piste 1: Marqueur  
 Piste 2: debris cellulaires  
 Piste 3 : protéines cytoplasmiques et périplasmiques  
 Piste 4 : membrane interne  
 Piste 5 : membrane externe soluble  
 Piste 6 : membrane externe insolubles

**Figure 52:** Analyse SDS- PAGE de la membrane

Piste 1    2    3    4    5    6    7



Piste 1: marqueur  
 Piste 2: lysat (3 µl)  
 Piste 3 : lysat (5 µl)  
 Piste 4 : 1<sup>er</sup> lavage  
 Piste 5 : 2<sup>ème</sup> lavage  
 Piste 6 : 1<sup>er</sup> éluat  
 Piste 7 : 2<sup>ème</sup> éluat

**Figure 53:** Analyse SDS-PAGE des fractions purifiées sur colonnes Ni-NTA.

Le motif 6His greffé à l'extrémité C- terminale de la protéine OmpEa 35, nous à permis de la purifier efficacement par chromatographie d'affinité sur colonne d'ions nickel immobilisés (Ni-NTA) .

OmpEa 35-6His étant une protéine membranaire intégrale, elle a d'abord été solubilisée par des détergents à partir de préparations de membranes externe avant d'être purifiée sur colonne.

L'analyse par SDS-PAGE, indique que la fraction correspondant aux protéines de membrane externe contient bien OmpEa 35 ainsi qu'une autre protéine de la membrane externe d'*E.coli* (**piste 5, figure 52 et piste 6, figure 53**), il s'agit de la protéine Omp A qui migre à 35 kda. Ces résultats montrent que la méthode de solubilisation employée est efficace, elle nous a permis de purifier OmpEa 35- 6His à partir d'une fraction très appauvrie en protéines contaminantes. Cependant, on retrouve dans cette fraction la forme ompEa 35- 6His capable de réagir avec le ligand Ni-NTA. Cette forme a été purifiée sur colonne Ni-NTA comme le révèle l'analyse par SDS-PAGE (**figure 53**).

**DISCUSSIONS**

**ET**

**PERSPECTIVES**

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La résistance acquise des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines par hyper-production d'une  $\beta$ -lactamase comme c'est le cas chez *E.aerogenes*, par efflux actif de l'antibiotique ou par imperméabilité membranaire a été étudiée depuis une quinzaine d'années [75].

Le mécanisme d'imperméabilité membranaire est habituellement relié à la diminution de l'expression des porines, la présence de ces protéines est donc primordiale pour la croissance des bactéries, elles constituent la voie de passage préférentielle des  $\beta$ -lactamines. Différentes porines ont été décrites chez *E.coli* (OmpC, OmpF, PhoE), présentant une forte homologie de séquences entre elles [82, 117, 122], chez *Klebsiella pneumoniae*, espèce taxonomiquement proche d'*E.aerogenes*, leurs analogues ont été appelés respectivement OmpK 36, OmpK 35 et PhoE.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à une des porines d'*Enterobacter aerogenes*, qui de nos jours est devenue un agent majeur des infections nosocomiales, la porine OmpEa 35 analogue à OmpK 35 de *Klebsiella pneumoniae*. Nous avons pu identifier la séquence du gène de cette porine grâce à la technique de la marche sur le génome « Genome Walker » réalisée sur la souche de référence d'*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, cette séquence est d'environ 1671 pb.

Un traitement bioinformatique nous a permis de comparer la séquence obtenue à différentes séquences qui existent dans la banque de données Genbank, ce qui confirme une forte homologie avec la séquence de la porine OmpK 35 de *Klebsiella pneumoniae*. La structure tridimensionnelle de la porine OmpK 35 a été déduite par analogie avec OmpF, chaque sous-unité du trimère est organisée en 16 feuilletts  $\beta$  antiparallèles ancrés dans la membrane externe grâce à une ceinture de résidus hydrophobes. Ils sont reliés entre eux du côté périplasmique par des boucles courtes et relativement conservées et du côté extracellulaire par des boucles longues et variables, ces dernières, directement exposées au milieu extérieur, jouent un rôle important dans la fonction récepteur (phage, bactériocines, épitopes) des porines. Une boucle particulière, la boucle L3, s'enfonce à l'intérieur du canal de la porine et délimite le diamètre du pore (0,7 nm sur 1,1 nm). Anisi, le flux des solutés peut être modifié par une perturbation de l'organisation de la zone de constriction formée par cette boucle interne.

Toutes les entérobactéries présentent le motif PEFGGD au niveau de la boucle L3. Les souches d'*Enterobacter aerogenes* Ea 3 et Ea C50249 présentent elles le motif VEWGGD. Des travaux précédents réalisés par l'équipe de Bornet au sein de notre laboratoire INSERM, unité CJF 96-06 sur les mêmes souches qui ont fait l'objet de notre travail de recherche, ont montré par immunodétection que l'expression des porines est quantitativement normale chez ces souches [21]. Ces mutations pourraient donc avoir un rôle dans la résistance de ces souches aux  $\beta$ -lactamines.

Lors d'une étude menée par Aurélie Thiolas et Claude Bollet au sein de notre laboratoire sur la porine 36 chez *E.aerogenes*, il a été démontré que les souches Ea 3 et Ea C50249 présentent le motif PEFDGD pour la porine 36. La substitution d'une glycine (acide aminé non chargé) en position 119 en un acide aspartique (chargé négativement) modifie l'encombrement stérique du pore de la porine Omp36. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de travaux récents, menés par notre équipe de recherche [159].

L'introduction d'un acide aminé avec une charge latérale (acide glutamique ou aspartique) au niveau de la boucle L3 de la porine OmpF d'*E.coli* a été entreprise par mutation dirigée. La présence de ce résidu chargé négativement au niveau de la boucle L3 crée un pont hydrogène avec un résidu ancré dans un feuillet  $\beta$  à l'opposé de la boucle L3. Cette liaison réduit considérablement la taille du diamètre du pore [198].

Les substitutions d'acides aminés pour les porines sont des réponses intéressantes pour la bactérie. En effet, la fonction porine est conservée, assurant ainsi l'importation des nutriments de faible poids moléculaire dans la bactérie. Mais l'introduction des mutations au niveau de la boucle L3 altère l'entrée des molécules de plus grande taille, comme les  $\beta$ -lactamines. Cette conservation de l'expression des porines, associée à un phénotype résistant est avantageuse par rapport à la baisse de l'expression des porines, qui se traduit par une augmentation du temps de génération, sans doute due à la baisse de la disponibilité des nutriments et métabolites.

L'alignement de séquences des porines des différentes souches testées d'*E.aerogenes* avec la souche de référence et avec la séquence modèle omp, permet également d'observer de nombreuses différences au niveau des boucles L1, L2, L6 qui sont plus courtes par rapport à celle d'OmpF et les boucles L7 et L8 qui sont plus longues. Nous observons ici une autre fonction des porines. Comme nous l'avons décrit précédemment, ces protéines possèdent des boucles longues et variables du côté extracellulaire L5, L6, L7 et L8.

Exposées dans le milieu extérieur, elles sont utilisées comme récepteurs par des phages ou des bactériocines (colicines A et N chez *E.coli*) [62]. Les mutations qui peuvent être rencontrées au niveau de ces boucles (au niveau de la boucle L7 pour la souche C50249, A318T) pourraient constituer un moyen de défense de ces bactéries face à ces agents toxiques, par altération de leurs sites de fixation.

Dans ce travail, nous avons montré aussi que le porine OmpEa 35 sous le contrôle de son promoteur n'a pas été fonctionnelle ou a été disparue. Dans certains cas, il semble que la disparition des porines soit la conséquence de mutations dans le LPS qui pourraient altérer alors la voie d'assemblage et/ou d'insertion fonctionnelle des protéines dans la membrane interne [100, 133]. La comparaison réalisée entre l'expression des porines et d'autres protéines de la membrane externe choisies comme standards permet de discriminer entre un effet pléiotropique sur la structure pariétale et un effet spécifique s'adressant à la régulation des porines; ainsi dans certains cas l'intervention de OmpX, IHF et micF, comme inhibiteurs de l'expression, a été proposée chez des isolats cliniques [133]. La réversibilité du processus a été observée quand la porine OmpEa 35 a été soumise au contrôle d'un autre promoteur avec la synthèse *de novo* des porines, ce qui suggère l'intervention d'un facteur de régulation sur l'expression. Il faut mentionner que l'on peut restaurer la sensibilité à des isolats résistants exhibants un défaut de porines, en exprimant la porine OmpEa 35 chez *E.aerogenes* 289 (**Tableau 10**); dans ces conditions, la porine adopte une conformation active comme récepteur à la surface bactérienne [102, 133], résultat qui élimine l'hypothèse d'un blocage lors de l'insertion dans la membrane.

Enfin nous avons pu reconstituer *in vitro* la porine OmpEa 35 d'*E.aerogenes* pour mener des études structurales et fonctionnelles. Nous avons pu surproduire et purifier la porine sous forme native. Le clonage du cadre de lecture sous le contrôle d'un promoteur du phage T7 et les tests d'expression dans deux hôtes *E.coli*, nous ont permis de parvenir à une bonne production d'OmpEa 35. De plus, grâce au motif 6 His grêffé à l'extrémité C-terminale de la protéine recombinante, nous avons pu la purifier par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

La purification de la protéine membranaire OmpEa 35 d'*E.aerogenes*, va nous permettre d'analyser les caractéristiques structurales et fonctionnelles du système en collaboration avec les biophysiciens. Dans un premier temps, nous envisageons de déterminer la structure tridimensionnelle de la porine et d'analyser les paramètres physico-chimiques de conductance, de sélectivité ionique..... du canal. Dans un second temps, identifier les gènes des porines Omp37 et PhoE d'*E.aerogenes* pour essayer de reconstituer le puzzle de l'ensemble des porines de l'enveloppe bactérienne d'*Eaerogenes* afin d'analyser les interactions entre les différents membres du système en présence de substrats. Enfin, nous tenterons de développer l'étude du promoteur de la porine OmpEa 35 pour mieux comprendre la régulation de l'expression qui permet de garder un contrôle rigoureux et précis sur la diffusion à travers la barrière membranaire.

## CONCLUSION

A l'heure actuelle les infections nosocomiales représentent par leur fréquence humaine et leur coût financier un grave problème de santé publique. Parmi les bactéries fréquemment isolées lors de ces infections hospitalières, *Enterobacter aerogenes* a une place en constante augmentation. Les souches d'*E. aerogenes* responsables d'épidémies en milieu intra-hospitalier présentent un phénotype de multi-résistance aux antibiotiques.

Différents mécanismes de résistance sont décrits chez *E.aerogenes* : inactivation enzymatique ; altération de la perméabilité membranaire ; mécanisme d'efflux ; modification de la cible d'antibiotique.

Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en thérapeutique hospitalière seuls ou le plus souvent associés aux aminosides et/ou aux fluoroquinolones dans le traitement des infections sévères à *E.aerogenes*. Un élément clé dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines ; les porines, protéines de la membrane externe constituant la voie de passage préférentielle de cette classe d'antibiotique. La porine OmpF d'*E.coli* est une des mieux caractérisées par les paramètres de son canal définis en bicouches et par la résolution de structure tridimensionnelle (3D) en cristallographie [133], son analogue chez *E.aerogenes* est la porine OmpEa 35, qui a fait le sujet de notre travail de recherche.

Ce travail nous a permis d'identifier un gène de porine chez *E.aerogenes*, la porine OmpEa 35 analogue à OmpK 35 de *Klebsiella pneumoniae* (espèce taxonomiquement proche d'*Enterobacter aerogenes*). La séquence du gène a été obtenue grâce à la technique « Genome Walker ».

Grâce à un traitement bioinformatique, la séquence obtenue a été comparée aux séquences existantes dans la banque de données «Genbank» confirmant son homologie avec la séquence du gène analogue ompK 35.

Nous avons pu montrer qu'en exprimant la porine OmpEa 35 chez des isolats résistants exhibants un défaut de porines, nous restaurons la sensibilité montrant que la disparition des porines est le résultat d'un mécanisme de régulation de l'expression de ces protéines, faisant intervenir un système à deux composants, envZ-OmpR, par l'intermédiaire d'un ARN antisens micF, par une autre protéine de la membrane OmpX ou par différentes cascades de senseurs-régulateurs [142].

L'alignement de séquences des différentes souches testées d'*Enterobacter aerogenes* a mis en évidence des mutations ponctuelles des différentes boucles. Il serait intéressant d'étudier ces mutations chez des souches d'*E.aerogenes* provenant de biotopes différents.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons pu surproduire et purifier la porine 35 d'*E. aerogenes* afin de pouvoir mener des études structurales et fonctionnelles.

En ce qui concerne *E.aerogenes*, plusieurs domaines sont en cours d'étude. Les systèmes de régulation des différents mécanismes de résistance connus sont seulement partiellement élucidés. Quand aux inducteurs multiples de la résistance, ils n'ont pas encore été identifiés. Parallèlement, de nouveaux phénotypes de résistance apparaissent régulièrement, tel que par exemple *E.aerogenes* résistant à l'imipénème et/ou à la gentamicine en l'an 2000. L'émergence de ces nouveaux phénotypes de résistance est à surveiller.

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

- 1- **Abbott, S., and M. Janda.** 1997. *Enterobacter cancerogenus* « *Enterobacter taylora* » infections associated with severe trauma or crush injuries. *Mic. Inf. Dis.* **107** : 359-361.
  
- 2- **Acolet, D., Z. Ahmet, E. Houang, R. Hurley, and M. E. Kaufmann.** 1994. *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit: account of an outbreak and its relationship to use of third generation cephalosporins. *J. Hosp. Infect.* **28**: 273-286.
  
- 3- **Al ansari, N., E. B. Mc Namara, R. J. Cunney, M. A. Flynn, and E. G. Smyth.** 1994. Experience with *Enterobacter* bacteraemia in a Dublin teaching hospital. **27**: 69-72.
  
- 4- **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1999. The *mar* regulon : multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends in Microbiology.* **7**(10): 410-413.
  
- 5- **Allaouiche, B. and A. Geisslei.** Ed. ESKA 2000. Infections bactériennes nosocomiales en réanimation: Le point de vue des cliniciens. p.p. 449-457.
  
- 6- **Allerberger, F., T. Koeth, C. Lass-Flörl, M. Dierich, C. Putensen, E. Scutzhard, I. Mohsenipour, H. Grundmann, D. Hartung, A. Bauernfeind, E. Eberlein, and J. Lupski.** 1996. Epidemiology of infections due to multiresistant *Enterobacter aerogenes* in a university hospital [letter]. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**(6): 517-521.
  
- 7- **Andresen, J., B. I. Asmar, and A. S. Dajani.** 1994. Increasing *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**: 787-792.
  
- 8- **Arpin, C., C. Coze, A. M. Rogues, J. P. Gachie, C. Bebear, and C. Quentin.** 1996. Epidemiological study of an outbreak due to multi-drug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **34** : 2163-2169 .
  
- 9- **Astagneau, P., S. Gottot, Y. Gobin, P. Bocquet, C. Gatignol, P. Jouvét, et G. Brucker.** 1994. Nosocomial outbreak of *Enterobacter agglomerans* pseudobacteraemia associated with non sterile blood collection tubes. *J. Hosp. Infect.* **27**: 73-75.

- 10- Avril, J. L., H. Dabernat, F. Denis, H. Monteil.** 2000. 3<sup>ème</sup> ed. Ellipses. Bacteriologie clinique, p.p. 171-173.
- 11- Avril, J. L. and Domino P. Y.** 1999. Les marqueurs épidémiologiques bactériens. In Les infections nosocomiales. p.p. 110-118.
- 12- Ballow, C. H., and J. J. Schentag.** 1992. trends in antibiotic utilisation and evolution resistance. Report of the national nosocomial resistance surveillance group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **15** (suppl. 2): 37S - 42S.
- 13- Bamberger, D. M., and S. L. Dahl.** 1992. Impact of voluntary vs enforced compliance third-generation cephalosporin use in a teaching hospital. *Arch. Intern. Med.* **152**: 554-557.
- 14- Baslé, A.** 1999. Caractérisation fonctionnelle de porine mutées ou altérées de bactéries nosocomiales et relations avec leur résistance aux antibiotiques. DEA de microbiologie fondamentale et appliquée. Université de Bretagne occidentale.
- 15- Bermudes, H., C. Arpin, F. Jude, Z. el-Harrif, C. Bebear, and C. Quentin.** 1997. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteria* in a French hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16** (7): 523-529.
- 16- Blanc, P., B. E. Von Elm, A. Geissler, I. Granier, A. Boussuges, and J. Durand Gasselin.** 1999. Economic impact of a rational use of antibiotics in intensive care. *Intensive Care Med.* **25**: 1407-1412.
- 17- Bogard, M. and J. Lamoril.** 1998. Biologie moléculaire en biologie clinique I . Méthodes. Elsevier, Paris. p.p. 56-120.
- 18- Bollet, C. and Ph. De Micco.** 1995. Taxonomie bactérienne. p. 27-58. In J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet (ed.), Manuel de Bactériologie Clinique, 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier, Paris.
- 19- Bornet, C., A. Davin-Régli, and C. Bollet.** Ed. ESKA 2000. *Enterobacter*. In Précis de Bacteriologie Clinique, p.p. 1175-1180.

- 20- Bornet, C., A. Davin-Regli, C. Bosi, J. M. Pagès, and C. Bollet.** 2000. Fast regulation of outer membrane permeability synthesis originated imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* prevalent type strains in France. *J. Clin. Microbiol.* **38** (3): 1048-1052.
- 21- Bornet, C., A. Davin-Regli, C. Bosi, J. M. Pagès, and C. Bollet.** 2000. Imipenem Resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J. Clin. Microbiol.* **38** : 1048-1052.
- 22- Bosi, C.** 2000. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques d'*Enterobacter aerogenes*. Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditerranée de Marseille.
- 23- Bosi, C., A. Davin-Regli, C. Bornet, M. Malléa, J. M. Pagès, and C. Bollet.** 1999. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *J. Clin. Microbiol.* **37** (7): 2165-2169.
- 24- Bouza, E., M. G. De La Torre, A. Erice, E. Loza, J. M. Diaz-Borrego, and L. Buzon.** 1985. *Enterobacter* bacteremia. An analysis of 50 episodes. *Arch. Intern. Med.* **145**: 1024-1027.
- 25- Brenner, D. J.** 1981. The genus *Enterobacter*. p. 1173-1180. In M. P. Starr, H. Stolp, and H. G. Schlegel (ed.), *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, Berlin.
- 26- Brovedani, S. Burnat, C., Leger, C, Rousseau, F., Plin, D. Dublanchet, A., and Pollet, J.** 2000. Rôle de l'électrophorèse en champ pulsé dans la prise en charge d'une épidémie à *Enterobacter aerogenes* multiresistant aux antibiotiques.
- 27- Burshard, K. W., D. T. Barral, M. Reed, and G. J. Slotman.** 1986. *Enterobacter* bacteremia in surgical patients. *Surgery.* **100**: 857-862.
- 28- Bush, K., S. K. Tanaka, D. P. Bonner, and R. B. Sykes .** 1985. Resistance caused decreased by penetration of  $\beta$ - lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobs. Agents Chemother.* **27**: 555-560.

- 29- Carlier, E., M. Piagnerelli, A. Deplano, P. Lejeune, and D. Govaerts.** 2000. Risks factors of infection and molecular typing in ICU colonized patients with *Enterobacter aerogenes*. 20° International Symposium on Intensive Care and Emergency Médecine, Congres Center, Brussels. 21-24 Mars 2000.
- 30- Chanal, C., D. Sirot, J. Romaszko, L. Bret, and J. Sirot.** 1996. Survey of prevalence of extended spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **38(1)**: 127-132.
- 31- Charrel, R., J. Pages, P. De Micco, and M. Mallea.** 1996. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(12)**: 2854-2858.
- 32- Chevalier, J., J-M. Pagès, and M. Malléa.** 1999. In vivo modification of porin activity conferring antibiotic resistance to *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266(1)**: 248-251.
- 33- Chow, J. W., M. J. Fine, D. N. Shlaes, J. P. Quinn, D. C. Hooper, M. P. Johnson, R. Ramphal, M. M. Wagener, D. K. Miyashiro, and V. L. Yu.** 1991. *Enterobacter* bacteriemia : clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Annals of Internal Medicine.* **15**: 585-590.
- 34- Chow, J. W., and D. N. Shlaes.** 1991. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**: 499-504.
- 35- Chow, J. W., V. L. Yu, and D. M. Shlaes.** 1994. Epidemiologic perspectives on *Enterobacter* for the infection control professional. *Am. J. Infect. Control.* **22**: 195-201.
- 36- Chung, Y.R., D. J. Bernner, A. G. Steigerwalt, B.S. Kim, H.T. Kim, and K.Y. Cho.** 1993. *Enterobacter pyrinus* sp. nov. , an organism associated with brown leaf spot disease of pear trees. *Int.J. Syst. Bacteriol.* **43** : 157-161.

- 37- Courvalin, P., and A. Phillipon.** 1990. Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. In Leon Le Minor 2<sup>ème</sup> ed. Bacteriologie Médicale. p.p.332-353.
- 38- Cowan, S. W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Gohsh, J. L. Rosenbush.** 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli*. Porins. *Nature*. **358**: 727-733.
- 39- D'Agata, E., L. Venkataraman, P. De Girolami, and M. Samore.** 1997. Molecular epidemiology of acquisition of ceftazidime-resistant gram-negative bacilli in a nonoutbreak setting. *J. Clin. Microbiol.* **35** (10): 2602-2605.
- 40- Davin-Regli, A.** 1995. Marquage épidémiologique par amplification aléatoire. Thèse de l'Université de la Méditerranée, Marseille.
- 41- Davin-Regli, A., C. Bollet, and Ph de Micco.** 1995. Les marqueurs épidémiologiques ; amplification aléatoire et marquage épidémiologique, p.p. 113-118. In J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet (ed.), Manuel de Bactériologie Clinique, 2 ed. Elsevier, Paris.
- 42- Davin-Regli, A., Y. Abed, R. N. Charrel, C. Bollet, and Ph. De Micco.** 1995. The variation of DNA template concentration significantly affects the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* **146**: 561-568.
- 43- Davin-Regli, A., D. Monnet, P. Saux, C. Bosi, R. Charrel, A. Barthelemy, and C. Bollet.** 1996. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: one-year prospective study in two intensive care units. *J. Clin. Microbiol.* **34**(6): 1474-1480.
- 44- Davin-Regli, A., P. Saux, C. Bollet, F. Gouin, and P. De Micco.** 1996. Investigation of outbreaks of *Enterobacter aerogenes* colonisation and infection in intensive care units by random amplification of polymorphic DNA. *J. Med. Microbiol.* **44**(2): 89-98.
- 45- Davin-Regli, A., C. Bosi, R. Charrel, E. Ageron, L. Papazian, P. A. Grimont, A. Cremieux, and C. Bollet.** 1997. A nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* strains with the *E. hormaechei* genotype in patients treated with fluoroquinolones. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1008-1010.

- 46- Daw, M. A., P. Munnely, S. R. Mc Cann, P. A. Daly, F. R. Falkiner, and C. T. Keane.** 1988. Value of surveillance cultures in the management of neutropenic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**: 742-747.
- 47- De Champs, C., M. P. Sauvant, C. Chanal, D. Sirot, N. Gazuy, R. Malhuret, J. C. Baguet, and J. Sirot.** 1989. Prospective survey of colonization and infection caused by Expanded-Spectrum -Beta-Lactamase-Producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2887-2890.
- 48- De Champs, C., D. Rouby, D. Guelon, J. Sirot, D. Beytout, and J. M. Gourgand.** 1991. Concomitant dissemination of three extended-spectrum betalactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in French hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**: 441-457.
- 49- De Champs, C., C. Henquell, D. Guelon, D. Sirot, N. Gazuy, and J. Sirot.** 1993. Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to *Enterobacter aerogenes* resistant to imipenem. *J. Clin. Microbiol.* **31**(1): 123-127.
- 50- De Champs, C., D. Sirot, C. Chanal, and J. Sirot.** 1999. A survey of extended spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* in France. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (I.C.A.A.C.), San Francisco, Septembre 1999.
- 51- De Gheldre, Y., N. Maes, F. Rost, R. De Ryck, P. Clevenbergh, J. L. Vincent, and M. J. Struelens.** 1997. Molecular epidemiology of an outbreak of multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* infections and in vivo emergence of imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 152-160.
- 52- Delcour, A. H.** 1997. Function and modulation of bacterial porins ; insights from electrophysiology. *FEMS Microbiol. Lett.* **151** : 115-123.
- 53- Drancourt, M.** 1998. Prescription des antibiotiques et résistance bactérienne, p.p.45-53. Maîtrise de la prescription des antibiotiques dans les hôpitaux, Elsevier, Paris.
- 54- Duval. J.** 1990. Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens. In Leon Le Minor. Biologie Médicale. 2<sup>ème</sup> ed. pp. 273-315.

- 55- Edwards, K. E., J. R. Allen, M. J. Miller, R. Yoger, P. C. Hoffman, R. Klotz, S. Marubio, E. Burkholder, T. Williams, and A. T. Davids.** 1978. *Enterobacter aerogenes* primary bacteremia in pediatric patients. *Pediatrics*. **62**: 304-306.
- 56- Ehrhardt, A. F., and C. C. Sanders.** 1993. Beta-lactam resistance among *Enterobacter* species. *J. Antimicrobial. Chemother.* **32**: 1-11.
- 57- Ehrhardt, A. F., C. C. Sanders, K. S. Thomson, C. Watanakunakorn, and I. Trujillano-Martin.** 1993. Emergence of resistance to imipenem in *Enterobacter* isolates masquerading as *Klebsiella pneumoniae* during therapy with imipenem/cilastatin. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 120-122.
- 58- Falkiner, F. R.** 1992. *Enterobacter* in hospital. *J. Hosp. Infect.* **20**: 137-140.
- 59- Farmer III, J. J., B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. Mc Whorter, G. P. Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, H. G. Wathen-Grady, C. Elias, G. R. Farmer, J.J. III, B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. McWorther, G. P. Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, Fanning, A. G. Steigerwalt, C. O'Hara, G. K. Morris, P. B. Smith, and D. J. Brenner.** 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 46-76.
- 60- Fawcett, C., J. C. Chawla, A. Quoraishi, and D. J. Sticker.** 1986. A study of the skin flora of spinal cord injured patients. *J. Hosp. Infect.* **8**: 149-158.
- 61- Flynn, D. M., R. A. Weinstein, C. Nathan, M. A. Gaston, and S. A. Kabins.** 1987. Patients endogenous flora as the source of nosocomial *Enterobacter* in cardiac surgery. *J. Inf. Dis.* **156**: 363-368.
- 62- Fourel, D., S. Hikita, J. M. BOLLA, S. Mizushima, and J. M. Pages.** 1990. Characterization of OmpF domains involved in *E. coli* K12 sensitivity to colicins A and N. *J. Bacteriol.* **172**: 3675-3680.
- 63- Freney, J.** Ed. ESKA 2000. Enterobacteriaceae- Généralités. In Précis de Bactériologie Clinique. pp. 1107-1113.

- 64- Gallhager, P. G.** 1990. *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 808-812.
- 65- Gaston, M. A.** 1987. *Enterobacter* : an emerging nosocomial pathogen. *J.Hosp.Infect.* **11**: 197-208.)
- 66- Gaston, M. A., M. A. Strickland, B. A. Ayling-Smith, and T. L. Pitt.** 1989. Epidemiological typing of *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 564-565.
- 67- Garrouste, M. and B. Schlemmer.** 1995. Relations entre colonisation bacterienne et infections acquises en réanimation. P. 149-162. In R. Thomas (ed.), *L'infection acquise en reanimation.*
- 68- Gavini, F., J. Mergaert, A. Beji, C. Mielcarek, D. Izard, K. Kersters, and J. De Ley.** 1989. Transfert of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1988) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** : 337-345.
- 69- Georghiou, P. R., R. J. Hamill, C. E. Wright, J. Versalovic, T. Koeuth, D. A. Watson, and J. R. Lupski.** 1995. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 84-94.
- 70- Glupezynski, Y., M. Delmée, H. Goossens, and M. Struelens.** 1998. A multicentre survey of antimicrobial resistance in gram-negative isolates from belgian intensive care units in 1994-1995. *Acta Clinica Belgica.* **53**(1):28-38.
- 71- Glupezynski, Y., Y. De Gheldre, P. De Mol, O. Ronveaux ,and M. Struelens.** 1999. Epidemiology of *Enterobacter aerogenes* in Belgian Hospitals : results of Begina national surveillance study in 1996-7. 39 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (I.C.A.A.C.), San Francisco, Septembre 1999.

- 72- Goldstein, F., Y. Pean, A. Rosato, J. Gertner, and L. Gutmann.** 1993. Characterization of ceftriaxone-resistant *Enterobacteriaceae*: a multicentre study in 26 French hospitals. Vigil'Roc Study Group. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**(4): 595-603.
- 73- Grattard, F., B. Pozzetto, P. Berthelot, I. Rayet, A. Ros, B. Lauras, and O. G. Gaudin.** 1994. Arbitrarily Primed PCR, Ribotyping and Plasmid Pattern Analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* in a Neonatal Intensive Care Unit. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 596-602.
- 74- Grattard, F., B. Pozzetto, L. Tabard, M. Petit, A. Ros, and O. G. Gaudin.** 1995. Characterization of nosocomial strains of *Enterobacter aerogenes* by arbitrarily primed-PCR analysis and ribotyping. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **16**: 224-230.
- 75- Gutmann, L. R. Williamson, N. Moreau, M. D. Kitzis, E. Collatz, J. F. Acar, and F. W. Goldstein.** 1985. Cross-Resistance to nalidixic acid, trimethoprim and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia*. *J. Inf. Dis.*, **151**: 501-507.
- 76- Hancock, R. E. W.,** 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiol.* **5**: 37-42.
- 77- Hibbert-Rogers, L., J. Heritage, D. Gascoyne-Binzi, P. Hawkey, N. Todd, I. Lewis, and C. Bailey.** 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**(1): 65-82.
- 78- Hirschman, S. Z., B. R. Meyers, K. bradbury, B. Mehl, S. Gendelman, and B. Kimelblatt.** 1988. Use of antimicrobial agents in a university teaching hospital: evolution of comprehensive controle program. *Arch. Intern. med.* **148**: 2001-2007.
- 79- Hopkins, J. M., and K. J. Towner.** 1990. Enhanced resistance to cefotaxime and imipenem associated with outer membrane protein alterations in *Enterobacter aerogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**: 49-55.

- 80- Houvenaeghel, M.** 1992. Les aminosides, p. 15-27. In C. Martin, F. Guoin, Antibiothérapie en réanimation et en chirurgie, Arnette, Paris.
- 81- Huber, J. W. and J. S. Thomas .** 1994. Detection of resistance due to inducible beta-lactamase in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2481-2486.
- 82- Inokuchi, K., Mutoh? N., Matsuyama, S. and Mizustima, S.** 1982. Primary structure of the OmpF gens that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K 12. *Nucleic Acids Res.* **10**: 6957-6968.
- 83- Izard, D., F. Gavini, P. A. Trinel, F. Krubwa, and H. Leclerc.** 1980. Contribution of DNA-DNA hybridization to the transfer of *Enterobacter aerogenes* to the genus *Klebsiella* as *K. mobilis*. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg.* **1**: 257-263.
- 84- Jalaluddin, S., J. M. Devaster, R. Scheen, M. Gérard, and J. P. Butzler.** 1998. Molecular epidemiological study of nosocomial *Enterobacter aerogenes* isolates in a Belgian hospital. *J. Clin. Microbiol.* **36** (7): 1846-1852.
- 85- Jarlier, V.** Ed. ESKA 2000. Mécanismes de résistance aux antibiotiques . In Précis de Bacteriologie clinique. p.p. 597-610.
- 86- Jarlier, V., M. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon.** 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* **10**(4): 867-878.
- 87- Jarlier V., and H. Nikaido.** 1990. permeability barrier to hydrophilic solutes in *M. chelonae*. *J. Bacteriol.* **172**: 1418-1423.
- 88- Jarvis, W. R., and W. J. Martone.** 1992. Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **29** (suppl. A): 19-24.
- 89- Joffin, J. N.** 2001. Enterobactéries ( document internet) p.p. 1-7.

- 90- Jones, R. N.** 1992. The current and futur impact of antimicrobial resistance among nosocomial bacterial pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Di.* 15(suppl. 2): 3S-10S.
- 91- karshikoff, A., S. W. Cowan, V. Spassov, R. Ladenstein, T. Schimer.** 1994. Electrostatic properties of two porin channel from *E. coli*. *J.Mol. Biol.* **240**: 372-384.
- 92- Kary, B. Mullis, François Ferré, and Richard A . Gibbs.** 1994. PCR, The Polymerase Chain Reaction. p.p. 3-66.
- 93- Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, and W. C. Winn.** 1997. Color atlas and Textbook of Diagnostic microbiology, 5<sup>th</sup> ed. Lippincott, Philadelphia.
- 94- Kosako, Y., K. Tamura, R. Sakazaki, and K. Miki.** 1996. *Enterobater kobei* sp. nov., a new species of the family *Enterobacteriaceae* resembling *Enterobacter cloacae*. *Curr.Microbiol.* **33**: 261-256.
- 95- Lakaye, B., A. Dubus, S. Lepage, S. Gros Lambert and J. M. Frère.** 1999. When drug inactivation renders the target irrelevant to antibiotic resistance : a case story with beta-lactams. *Mol. Microbiol.* **31**(1): 89-101.
- 96- Larsen, R. A., P. S. Myers, J. T. Skare, C. L. Seachord, R. P. Darveau, and K. Postle.** 1997. Identification of TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *J. Bacteriol.* **178**: 1363-1373.
- 97- Larzul. L.** 2000. La PCR un procédé de replication *in vitro*. pp. 23-75.
- 98- Lee, E. H., E. Collatz, I. Podglajen, and L. Gutmann.** 1997. A rob-like gene of *Enterobacter cloacae* affecting porin synthesis and susceptibility to multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2029-2033.
- 99- Lee, E. H., M. H. Nicolas. M. D. Kitzis, G. Pialoux, E. Collatz, and L. Gutmann.** 1991. Association of two resistance mechanisms in a clinicate isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1093-1098.

- 100- Leying, H., W. Cullmann, and W. Dick.** 1991. Carbapenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is due to lipopolysaccharide alterations. *Chemotherapy*. **37**: 106-113.
- 101- Livrelli, V., C. De Champs, P. Di Martino, A. Darfeuille-Michaud, C. Forestier, and B. Joly.** 1996. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1963-1969.
- 102- Malléa, M., V. Simonet, L. Eun-Hee, E. Collatz, R. Gervier, L. Gutmann, and J. M. Pagès.** 1995. Biological and immunological comparisons of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli* porins. *FEMS Microbiol.Lett.* **129**: 273-280.
- 103- Malléa, M., J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, and J. M. Pagès.** 1998. Porin alteration and active efflux : two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology*. **144**: 3003-3009.
- 104- Markowitz, S. M., S. M. Smith, and D. S. Williams.** 1983. Retrospective analysis of plasmid patterns in a study of burn unit outbreaks of infection due to *Enterobacter cloacae*. *J. Infect. Dis.* **148**: 18-23.
- 105- Marmonier, A.** Ed. ESKA 2000. Le diagnostic phénotypique. In Précis de bactériologie Clinique. p.p. 79-99.
- 106- Masi, M.** 2001. Surexpression et purification des protéines constituant la pompe d'efflux Acr AB-Tol C d'*Enterobacter aerogenes*. Diplôme d'Etudes Approfondies à l'Université de La Méditerranée de Marseille, encadrée par Elizabeth Pradel. p.p.1-20.
- 107- Maslow, J. N., Mulligan M. E., and Arbeit R. D.** 1993. Molecular epidemiology of contemporary techniques to the typing of micro organismw. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 153-164.
- 108- Meunier, O., P. Stoessel, P. Saint-Laurent, P. Lutun, F. Jehl, J. Scheftel, H. Monteil, J. Tempe, and M. Bientz.** 1997. [Role of hygiene and bacteriological laboratories in the management of an epidemic of *Enterobacter aerogenes* multiresistant to antibiotics]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **55(2)**: 129-137.

- 109- Meyers, H. B., E. Fontanilla, and L. Mascola.** 1988. Risk factors for development of sepsis in a hospital outbreak of *Enterobacter aerogenes*. *Am. J. Infect. Control.* **16**: 118-122.
- 110- Meyers, K. S., C. Urban, J. A. Eagan, B. J. Berger, and J. J. Rahal.** 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann. Intern. Med.* **119**: 353-358.
- 111- Michowitz, M., H. Nagar, S. A. Berger, and D. Chayen.** 1985. Crepitant cellulitis due to *Enterobacter aerogenes*. *Isr. J. Med. Sci.* **21**: 546-547. (133)
- 112- Michel-Briand, Y.** 1986. Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques, 1<sup>ère</sup> édition, Masson, Paris.
- 113- Miller, P. F. and M. C. Sulavik.** 1996. Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 441-448.
- 114- Minor, L. L., Ph Sansonetti, C. Richard, F. Grimont, H. H. Mollaret, H. Bercovier and J. M. Alonso.** Flammarion 1990. Enterobactéries. In Leon Le Minor. Bacteriologie Médicale, 2<sup>ème</sup> ed. p.p. 389-465.
- 115- Mirza, G. E., S. Karakuçuk, M. Dooganay, and A. Caoglayangil.** 1994. Post operative endophthalmitis caused by an *Enterobacter* species. *J. Hosp. Infect.* **26**: 167-172.
- 116- Miro, E., C. Alonso, F. Navarro, B. Mirelis, and G. Prats.** 1995. Resistencia al imipenem en *Enterobacter aerogenes*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **13** : 278-282.
- 117- Mizuno, T., Chou, M. Y. and Inouye, M.** 1983. A comparative study on the genes for three porins of *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated ompC gene. *J. Biol.Chem.* **258**: 6932-6940.
- 118- Mizuno, T., and S. Mizushima.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4**: 1077-1082.

- 119- Monnet, D., W. Hansen, C. Bollet, and J. Freney.** 1992. Entérobactéries autres que *Salmonella*, *Shigella* et *Escherichia coli*. *Lyon Pharmaceutique*. **4**: 263-306.
- 120- Monnet, D., and C. Richard.** 1995. Autres *Enterobacteriaceae*, p. 1053-1128. In J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet (ed.), *Manuel de Bactériologie Clinique*, 2 ed. Elsevier, Paris.
- 121- Mourey, L., L. P. Kotra, J. Bellettini, A. Bulychev, M. O'Brien, M. J. Miller, S. Mobashery, and J-P. Samama.** 1999. Inhibition of the broad spectrum nonmetallocarbapenemase of class A (NMC-A)  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* by Monocyclic  $\beta$ -lactams. *J. Biol. Chem.* **274** (36): 25260-25265.
- 122- Mutoh, N., Inokuchi, K. and Mizushima, S.** 1982. Amino acid sequence of three signal peptide of OmpF, a major outer membrane protein of *escherichia coli*, *FEBS lett.***137**: 171-174.
- 123- Nauciel, C., A. Philippon, E. Ronco, J. Pilliot, M. Guenounou, G. Paul, D. Brunel, and H. D. Outin.** 1985. Septicémies à *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*: émergence de variants résistants (céphalosporinase déréprimée) en cours de traitement par des céphalosporines de troisième génération. *Presse Méd.* **14**:673-676.
- 124- Neuwirth, C., E. Siebor, J. Lopez, A. Pechinot, and A. Kazmierczak.** 1996. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **34**(1):76-9.
- 125- Nicklin, J. K. Graeme-Cook, T. Paget and R. Killington.** Ed. BERTI 2000. L'essentiel en Microbiologie. pp. 87-88.
- 126- Nikaido, H., E. Y. Rosenberg, and J. Foulds.** 1983. Porin channel in *E. coli*: studies with  $\beta$ -lactams in intact cells. *J. Bacteriol.* **153**: 232-240.
- 127- Nikaido, H.** 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 3905-3908.

- 128- Nikaido H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets : permeability barriers and active efflux. *Science*. **264**: 382-388.
- 129- Nikaido, H;** 1996. Outer membrane. p.p. 29-47. In : Neidhardt, F. C. (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and Molecular Biology. *ASM Press, Washington, DC*.
- 130- Noriega, F.R., K.L. Kotloff, M.A. Martin, and R.S. Schwalbe.** 1990. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Ped. Infect. Dis. J.* **9**: 447-449.
- 131- Olson, B., R. A. Weinstein, C. Nathan, and S. A. Kabins.** 1983. Broad-spectrum beta-lactam resistance in *Enterobacter* : emergence during treatment and mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **11**: 299-311.
- 132- Pages, J-M.** Ed. ESKA 2000. Une stratégie bactérienne : La gestion de la perméabilité membranaire. In Précis de Bactériologie Clinique. p.p. 371-379.
- 133- Pages, J. M., and M. Malléa.** 1999. Porines et résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries. p.98-102. Antibiotiques, Masson, Paris.
- 134- Péchère, J-C.** 1994. Antibiotic resistance is selected primarily in our patients. *Inf. Control. Hosp. Epidemiol.* **15**: 472-477.
- 135- Pena, C., M. Pujol, R. Pallares, M. Cisnal, J. Ariza, and F. Gudiol.** 1993. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter* spp. epidemiology and prognostic factors. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **11**: 424-428.
- 136- Philippon, A., R. Labia, et G. Jacoby.** 1989. Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Agents Chemother.* **33**: 1131-1136.
- 137- Pitout, J. D. D., E. S. Moland, C.C. Sanders, K. S. Thomson, and S. R. Fitzsimmons.** 1997.  $\beta$ -lactamases and detection of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** : 35-39.

- 138- Pitout, J., K. Thomson, N. Hanson, A. Ehrhardt, P. Coudron, and C. Sanders.** 1998. Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(3): 596-600.
- 139- Ploy, M., C. Grelaud, C. Martin, and F. Denis.** 1997. [Emergence of *Enterobacter aerogenes* strains producing derepressed cephalosporinase at CHU in Limoges: molecular epidemiology by the RAPD technique]. *Pathol. Biol. (Paris)*. **45**(5): 404-408.
- 140- Poilane, I., P. Gruaud, E. Lachassinne, P. A. D. Grimont, F. Grimont, M. Collin, J. Gandelus, J. C. Tortolin, and A. Collignon.** 1993. *Enterobacter cloacae* cross-colonization in neonates demonstrated by ribotyping. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 820-826.
- 141- Power, E. G. M.** 1996. RAPD typing in microbiology. A technical review. *J. Hosp. Infect.* **34**: 247-265.
- 142- Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson, and T. J. Silhavy.** 1996. From acids to osmZ: multiple factor influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**: 911-917.
- 143- Prevot, M. H., A. Andreumont, H. Sancho-Garnier, and C. Tancrede.** 1986. Epidemiology of intestinal colonization by members of the family *Enterobacteriaceae* resistant to cefotaxime in a hematology-oncology unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**: 945-947.
- 144- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general protein secretory pathway in Gram negative bacteria. *Micobiol. Review.* **57**: 50-108.
- 145- Raimondi, A., A. Pessina, M. G. Neri, C. De Champs, M. P. Sauvart, C. Chanal, D. Sirot, N. Gazuy, R. Malhuret, J. C. Baguet, and J. Sirot.** 1997. Loss of porins following carbapenem-resistance selection and adherence modification in *Enterobacteria* Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2887-2890.
- 146- Raoult, D.** Elsevier. 1998. Dictionnaire des maladies infectieuses. p.p.

- 147- Rello, J. E. Quantana, B. Mirelis, M. Gurgui, A. Net, and G. Prats.** 1993. Polymicrobiologic characteristics and Factors influencing mortality in 111 episodes. *Intensive Care Med.* **20**: 94-98.
- 148- Rice, L. B., E. C. Eckstein, J. De Vente, and D. M. Shaes.** 1996. Ceftazidime resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland department of veterans affairs medical center. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 118-124.
- 149- Richard, C.** 1984. Genus VI. *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960, 72<sup>AL</sup>;Nom. Cons. Opin. 28, Jud. Comm. 1963, 38, p.p. 465-469. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1 ed Williams & Wilkins, Baltimore.
- 150- Rimbault, A. and François N. R. Renaud.** Ed. ESKA 2000. Le métabolisme des micro organismes d'intérêt médical. In *Précis de Bacteriologie Clinique*. p.p. 53-78.
- 151- Sanders, C. C.** 1987. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 573-593.
- 152- Sanders, W. E., and C. C. Sanders,** 1997. *Enterobacter* spp. : pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Cliv. Microbiol. Rev.* **10** : 220-241.
- 153- Schaberg, D. R., Culver, D. H., and R. P. Gaynes.** 1991. Majors trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *AM. J. Med.* **91**(suppl. 3B): 72S-75S.
- 154- Schindler, H.** 1989. Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions. *Methods Enzymol.* **171**: 225-253.
- 155- Schirmer, T.** 1998. General and specific porins from bacterial outer membranes. *J. Struct. Biol.* **121**: 101-109.
- 156- Seters, C. C.** 1991. New beta-lactams : New problems for the internist. *Annals of Internal Medicine.* **115**: 650-651.

- 157- Siebert, P. D. Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. and Lukyanov, S. A.** 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1087- 1088.
- 158- Simonet, V., M. Mallea, D. Fourel, J. Bolla, and J. Pages.** 1996. Crucial domains are conserved in *Enterobacteriaceae* porins. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**(1): 91-97.
- 159- Simonet, V., M. Mallea, D. Fourel, J. Bolla, and J. Pages.** 2000. Substitutions in the Eyelet Region Disrupt Cefepime Diffusion through the *Escherichia coli* Omp F Channel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **44**: 311-315.
- 160- Singleton, P.** Dunod 1999. Bacteriologie, 2ème cycle, 4<sup>ème</sup> ed.. p.p. 114-182.
- 161- Soulier, A., F. Barbut, J. Ollivier, J. Petit, and A. Lienhart.** 1995. Decreased transmission of *Enterobacteriaceae* with extended-spectrum beta-lactamases in an intensive care unit by nursing reorganization. *J. Hosp. Infect.* **31**(2): 89-97.
- 162- Steffee, C. H. et B. L. Wasilauskas.** 1992. Beta-lactamase expression and cross-resistance to beta-lactam antibiotics in a nosocomial population of *Enterobacter*. *Chemotherapy.* **38**: 291-296.
- 163- Steigerwalt, A. G., G. R. Fanning, M. A. Fife-Asbury, and D.J. Brenner.** 1976. DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. *Can. J. Microbiol.* **22**: 121-137.
- 164- Stoorvogel, J., M. J. A. W. M. van Bussel, and J. A. M. van de Klundert.** 1991. Biological characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). *J. Bacteriol.* **173**: 161-167.
- 165- Stoorvogel, J., M. J. A. W. M. van Bussel, and J. A. M. van de Klundert.** 1991. Molecular characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). *J. Bacteriol.* **173**: 156-160.
- 166- Tagu, D.** Ed. INRA 1999. Principes des techniques de biologie moléculaire. p.p. 3-129.

- 167- Tancovic, J.** 2000. Mécanismes d'action des antibiotiques, p.p. 583-595. In J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet (ed.), Manuel de Bactériologie Clinique, 3 ed. ESKA, Paris.
- 168- Thiolas, A.** 2000. Identification d'un gène de porine d'*Enterobacter aerogenes*. Diplôme d'études approfondies à l'Université de la Méditerranée, encadrée par Claude Bollet. p.p. 1-22.
- 169- Thomson, K. S., C. C. Sanders, and H. Chmel.** 1993. Imipenem resistance in *Enterobacter*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 6103.
- 170- Trias, J., J. Dufresne, R. C. Levesque, and H. Nikaido.** 1998. Decreased outer membrane permeability in imipenem resistant mutants of *P. aeruginosa*. *Antimicrob. Chemother.* **33**: 1201-1206.
- 171- Turner, P. C., A. G. Mc Lennan, A. D. Bates and M. R. H. White.** Ed. BERTI 2000. L'essentiel en Biologie Moléculaire. p.p. 105-178.
- 172- Tzouvelekis, L., E. Tzelepi, A. Mentis, A. Vatopoulos, and A. Tsakris.** 1992. Imipenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is associated with derepression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**(2-3): 195-199.
- 173- Tzouvelekis, L. S., E. Tzelepi, M. E. Kaufmann, and A. F. Mentis.** 1994. Consecutive mutations leading to the emergence *in vivo* of imipenem resistance in a clinical strain of *Enterobacter aerogenes*. *J. Med. Microbiol.* **40**: 403-407.
- 174- Valles, J. C. Leon, and F. Alvarez-Lerma.** 1997. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. Spanish Collaborative group for Infections in Intensive care units.
- 175- Van Gansen, P. and H. Alexandre. Masson.** 1997. 4<sup>ème</sup> ed.. Biologie générale. p.p. 339-349.

- 176- Voss, A., W. J. Melchers, P. Van den Hurk, K. A. Bergman, P. E. Verweij, and J. F. Meiss.** 1994. Fingerprinting with the PCR confirmation of a *E. cloacae* epidemic in a neonatal IUC. *Immun. Infect.* **22**: 214-217.
- 177- Watanakunakorn, C., and M. Weber.** 1989. *Enterobacter* bacteremia : A review of 58 episodes. *Scand. J. Infect. Dis.* **21**: 6-13.
- 178- Weinstein, R. A.** 1986. Endemic emergence of cephalosporin-resistant *Enterobacter* : relation to prior therapy. *Infect. Control.* **7**: 120-123.
- 179- Weischer, M., and H. J. Kolmos.** 1992. Retrospective 6-year study of *Enterobacter* bacteremia in a Danish university hospital. *J. Hosp. Infect.* **20**: 15-24.
- 180- Weiss, M. S., U. Abele, J. Weckesser, W. Welte, E. Schiltz, and G. E. Schulz.** 1991. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* **254**: 1627-1630.
- 181- White, A. C., R. L. Atmar, J. Wilson, T. R. Cate, C. E. Stager, and S. B. Greenberg.** 1997. Effects of Requiring Prior authorization for selected antimicrobials : expenditures, susceptibilities, and clinical outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **25**: 230-239.
- 182- Willmott, C.J.R., S.E. Critchlow, C. Eperon, and A. Maxwell.** 1994. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **242**: 351-363.
- 183- Woods, C. R., J. Versalovic, T. Koeuth, and J. R. Lupski.** 1992. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA finger-prints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2921-2929.

#### **Autres références bibliographiques :**

- 184- Agence Nationale pour le Développement de l'Évaluation Médicale (ANDEM).** 1996. Le bon usage des antibiotiques à l'hôpital. Ed NHA Communication, Paris.

- 185- Anonyme** . 2001. *Enterobacter aerogenes*: pathogène nosocomiale majeur de l'an 2000. (document internet) p.p.1-44.
- 186- Anonyme** . 2001. Resistance aux antibiotiques. (document internet). p.p.1-11.
- 187- Anonyme** . 2001. American Type Culture Collection. p.p. 1-2.
- 188- Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie**. 1998. extrait de Pathologie Biologie, 1998. **46**, n° 8, I-XVI.
- 189- Comité Technique National des Infections Nosocomiales**. 1998. Isolement septique.
- 190- Comité Technique National des Infections Nosocomiales**. 1998. 100 recommandations pour la prévention des infection nosocomiales. 2 ed.
- 191- Comité Technique National des Infections Nosocomiales**. 1999. Maîtriser la diffusion des bactéries multirésistante aux antibiotiques.
- 192- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France**. 1992. 100 recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.
- 193- International Journal of Systematic Bacteriology**. 1988. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectivly published outside the IJSB. List no 25. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38** : 220-222.
- 194- Kit Amicon Microcon PCR Purification System**. 2000.
- 195- Kit Concert Gel Extraction System**, GibcoBRL. 2000.
- 196- Kit QIA quick QIAgen** (extraction d'AND), 2001.
- 197- Ni-NTA Spin kit** (purification de l'AND), 2000.
- 198- pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems**. Promega, 1998.

**199-** pET 24 a (+), Novagen, 1997.

**200-** QIAgen PCR Cloning Kit (pDrive), 2001.

**201-** Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles Gram Négatif, API 20 E. Bio Mérieux.

**202-** Universal Genome Walker kit. CLONTECH, 2000.

**203-** Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Promega, 2000.



# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. CLASSIFICATION .....	4
2. HABITAT .....	5
3. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES.....	5
3. 1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES .....	5
3. 2. CARACTERES CULTURAUX.....	5
3. 3. CARACTERES BIOCHIMIQUES .....	6
3. 4. CARACTERES ANTIGENIQUES .....	6
4. MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES D' <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	7
4. 1. MARQUEURS PHENOTYPIQUES .....	7
4. 1. 1. LA BIOTYPAGE.....	7
4. 1. 2. LA SEROTYPAGE .....	8
4. 1. 3. LA LYSOTYPAGE .....	8
4. 1. 4. L'ANTIBIOTYPAGE.....	8
4. 1. 5. LA BACTERIOCYNOTYPAGE .....	9
4. 2. MARQUEURS GENOTYPIQUES.....	9
4. 2. 1. L'ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE OU PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS ....	10
(PFGE) .....	10
4. 2. 2. TYPAGE APRES AMPLIFICATION PAR PCR .....	10
5. STRUCTURE MEMBRANAIRE D' <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	15
5. 1. PEPTIDOGLYCANE (OU MUREINE).....	15
5. 2. MEMBRANE EXTERNE .....	16
5. 3. LES PORINES .....	18
5. 3. 1. STRUCTURE DES PORINES.....	18
5. 3. 2. FONCTIONS DES PORINES.....	22
5. 3. 3. REGULATION DE L'EXPRESSION DES PORINES.....	22
5. 3. 4. RESISTANCE ET PERMEABILITE MEMBRANAIRE.....	27
6. EPIDEMIOLOGIE D' <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	29
7. INFECTIONS NOSOCOMIALES A <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	33
7. 1. FACTEURS PREDISPOSANTS .....	33
7. 2. LES DIFFERENTES INFECTIONS NOSOCOMIALES A ENTEROBACTER AEROGENES .....	34
8. RESISTANCE D' <i>Enterobacter aerogenes</i> AUX ANTIBIOTIQUES.....	36
8. 1. LES TYPES DE RESISTANCE .....	37
8. 2. MECANISME D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES.....	37
8. 2. 1. MECANISME D'ACTION DES $\beta$ -LACTAMINES .....	37

8. 3. MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES .....	40
8. 3. 1. INACTIVATION ENZYMATIQUE.....	41
8. 3. 2. ALTERATION DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE.....	43
8. 3. 3. MECANISME D'EFFLUX .....	45
8. 3. 4. MODIFICATION DE LA CIBLE DE L'ANTIBIOTIQUE.....	45
8. 4. RESISTANCE MULTIPLE AUX ANTIBIOTIQUES (MULTI DRUG RESISTANT) (MDR).....	46
8. 4. 1. GENERALITES .....	46
8. 4. 2. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE LA MULTI-DRUG RESISTANCE .....	47
8. 5. SITUATION ACTUELLE.....	50
8. 5. 1. STRATEGIE THERAPEUTIQUE ET POLITIQUE DE PREVENTION .....	50
8. 5. 2. STRATEGIE THERAPEUTIQUE.....	53
8. 5. 3. POLITIQUE D'HYGIENE .....	54

## **PARTIE PRATIQUE**

MATERIEL.....	56
1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	56
1. 1. SOUCHE DE REFERENCE .....	56
1. 2. SOUCHES CLINIQUES.....	56
2. MATERIEL UTILISE AU LABORATOIRE.....	58
2. 1. OUTILS BIOLOGIQUES .....	58
2. 2. Appareillage .....	58
2. 3. Milieux de culture et réactifs utilisés .....	59
2. 4. Autre matériel.....	59
METHODES.....	60
1. VERIFICATION DE LA PURETE DES SOUCHES .....	60
2. ETUDE MICROSCOPIQUE .....	60
3. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE.....	60
3. 1. PRINCIPE.....	60
3. 2. MODE OPERATOIRE.....	60
3. 3. LECTURE.....	61
4. TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	62
4. 1. LES ANTIBIOTIQUES TESTES .....	62
4. 2. TECHNIQUE.....	62
4. 2. 1. PREPARATION DES SUSPENSIONS BACTERIENNES .....	62
4. 2. 2. PREPARATION DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ANTIBIOTIQUES.....	62
4. 2. 3. ENSEMENCEMENT .....	62
4. 2. 4. LECTURE.....	63

5. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE .....	63
5. 1. PRINCIPE.....	63
5. 2. EXTRACTION A L'HEXADECYLTRIMETHYL AMMONIUM BROMURE (CTAB) [22, 168]....	63
5. 2. 1. REACTIF UTILISES .....	63
5. 2. 2. TECHNIQUE .....	63
5. 3. EXTRACTION PAR KIT QIA QUICK QIAGEN .....	65
5. 3. 1. REACTIFS UTILISES .....	65
5. 3. 2. TECHNIQUE .....	65
5. 4. Migration électrophorétique .....	68
5. 4. 1. REACTIFS UTILISES .....	68
5. 4. 2. PREPARATION DU GEL .....	68
5. 4. 3. PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER.....	69
5. 4. 4. LE DEPOT .....	69
5. 4. 5. MIGRATION.....	69
5. 4. 6. COLORATION AU B.E.T.....	69
5. 4. 7. VISUALISATION SOUS ULTRA- VIOLETS .....	69
6. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) .....	70
6. 1. PRINCIPE.....	70
6. 2. APPLICATION DE LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION (PCR) SUR L'ADN DE LA SOUCHE DE REFERENCE ATCC 13048.....	72
6. 2. 1. OUTILS BIOLOGIQUES.....	72
6. 2. 2. TECHNIQUE .....	72
6. 3. PURIFICATION ET SEQUENÇAGE .....	73
7. CLONAGE DU GENE PARTIEL DE PORINE ANALOGUE A OmpK 35 .....	76
7. 1. PRINCIPE .....	76
7. 2. REACTIFS UTILISES .....	77
7. 3. TECHNIQUE DE CLONAGE EN UTILISANT LE VECTEUR PGEM® -T .....	77
7. 4. INCORPORATION DU PLASMIDE RECOMBINANT A L'HOTE.....	78
7. 4. 1. PRINCIPE .....	78
7. 4. 2. REACTIFS UTILISES.....	78
7. 4. 3. CHOIX DE L'HOTE .....	79
7. 4. 4. PREPARATION DES CELLULES COMPETENTES .....	79
7. 4. 5. PROTOCOLE DE LA TRANSFORMATION.....	79
7. 4. 6. CHOIX DE CLONES : (DEPISTAGE BLEU-BLANC) .....	80
7. 5. AMPLIFICATION DES PRODUITS CLONES .....	81
8. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE .....	81
8. 1. PRINCIPE .....	81
8. 2. EXTRACTION PAR LE KIT « WIZARD PLUS SV MINI PREP » (PROMEGA).....	82
8. 3. REACTIFS UTILISES FOURNIS DANS LE KIT .....	83
8. 4. TECHNIQUE.....	83
9. SEQUENÇAGE PAR PROGRESSION SUR LE GENOME (GENOME WALKER) .....	84
9. 1. PRINCIPE.....	86
9. 2. REACTIFS UTILISES .....	86
9. 3. TECHNIQUE.....	87
9. 3. 1. RESTRICTION.....	87
9. 3. 2. LIGATION AVEC L'ADAPTATEUR GENOME WALKER .....	88

9. 3. 3. Détermination des amorces .....	89
9. 3. 4. Amplification par PCR (primaire et secondaire).....	89
9. 3. 5. Séquençage du gène complet analogue à ompK 35 .....	91
10. TRAITEMENT BIOINFORMATIQUE .....	91
10. 1. CHOIX DES AMORCES .....	91
10. 2. ASSEMBLAGE DE SEQUENCES.....	91
10. 3. RECHERCHE D'HOMOLOGIE ET ALIGNEMENT DE SEQUENCES .....	92
10. 4. CARTE DE RESTRICTION .....	92
11. ROLE DE LA PORINE OmpEa 35 DANS LE RETOUR A LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES .....	92
11. 1. LA PORINE OmpEa 35 SOUS LE CONTROLE DE SON PROMOTEUR.....	92
11. 1. 1. Réactifs utilisés .....	93
11. 1. 2. Protocole.....	93
11. 2. LA PORINE OmpEa 35 SOUS LE CONTROLE DU PROMOTEUR LAC Z.....	95
11. 2. 1. Réactifs utilisés .....	96
11. 2. 2. Protocole.....	97
12. ETUDE DES SEQUENCES DES GENES DE SOUCHES CLINIQUES A <i>E.aerogenes</i> 99	
12. 1. AMPLIFICATION PAR PCR.....	99
12. 2. SEQUENÇAGE.....	99
12. 3. ALIGNEMENT DE SEQUENCES.....	100
13. SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PORINE OmpEa 35.....	100
13. 1. REACTIFS UTILISES .....	101
13. 2. PREPARATION DE L'INSERT .....	102
13. 2. 1. Amplification par PCR.....	102
13. 2. 2. Ligation avec le pGEM-T .....	103
13. 2. 3. Analyse des plasmides recombinants.....	104
13. 2. 4. Digestion enzymatique par Xho I et Nde I.....	104
13. 2. 5. Purification de bande par kit Concert Gel Extraction Systems GibcoBRL .....	104
13. 3. PREPARATION DU VECTEUR D'EXPRESSION pET 24 a <sup>+</sup> (NOVAGEN): .....	107
13. 3. 1. Digestion enzymatique.....	107
13. 3. 2. Purification de bande à partir du gel .....	107
13. 4. SOUS- CLONAGE DE L'INSERT DANS LE VECTEUR pET 24 a <sup>+</sup> .....	109
13. 4. 1. Ligation .....	109
13. 4. 2. Transformation .....	109
13. 5. CONDITIONS D'EXPRESSION.....	110
13. 6. OBTENTION DES LYSATS CELLULAIRES TOTAUX .....	110
13. 7. PREPARATION DES FRACTIONS SOLUBLES ET INSOLUBLES .....	110
13. 8. EXTRACTION DE MEMBRANE EXTERNE .....	111
13. 9. PURIFICATION D'OMPEA 35- HIS TAG PAR KIT Ni-NTA.....	111
13. 9. 1. Réactifs utilisés .....	112
13. 9. 2. Protocole.....	112
14. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE).....	113
14. 1. PREPARATION .....	113
14. 2. MIGRATION .....	114
14. 3. COLORATION DES GELS AU BLEU .....	115

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

1. EXAMENS MICROSCOPIQUES.....	117
2. CARACTERES CULTURAUX .....	117
3. CARACTERES BIOCHIMIQUES.....	117
4. TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	118
5- PROFIL D'EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE.....	119
6. AMPLIFICATION PAR PCR .....	119
7. CLONAGE.....	120
8. GNOME WALKER .....	120
9. SEQUENÇAGE .....	124
10. ALIGNEMENT DE SEQUENCES .....	124
11. DETERMINATION DE LA CARTE DE RESTRICTION.....	132
12. ROLE DE LA PORINE OmpEa 35 DANS LE RETOUR A LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES .....	132
12. 1. LA PORINE OmpEa 35 SOUS LE CONTROLE DE SON PROMOTEUR.....	132
12. 2. LA PORINE OmpEa 35 SOUS LE CONTROLE DU PROMOTEUR LAC Z .....	134
13. ETUDE DES SEQUENCES DES GENES DE SOUCHES D' <i>E. aerogenes</i> .....	137
14. SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PORINE OmpEa 35.....	138
14. 1. AMPLIFICATION PAR PCR.....	138
14. 2. DIGESTION ENZYMATIQUE PAR NDE I, XHO I.....	143
14. 3. SURPRODUCTION DE LA PROTEINE MEMBRANAIRE CHEZ <i>E. COLI</i> .....	144
14. 4. PREPARATION DES FRACTIONS SOLUBLES ET INSOLUBLES .....	145
14. 5. PURIFICATION DE OmpEa 35 - 6HIS PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE .....	146
<i>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</i> .....	148
<i>CONCLUSION</i> .....	151
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> .....	
<i>ANNEXES</i>	