



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie microbienne

Intitulé :

Incidence de *Staphylococcus sp.* dans les affections bovines : Prédiction des structures 2D du gène rRNA 16S pour le diagnostic bactérien

Présenté et soutenu par : Chemseddine KADRI

Le : 16/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : Y. BENHIZIA (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : M. A. HAMIDECHI (Professeur - UFM Constantine).

Examineur : M. GAGAOUA (Maître de Conférences A ó INATAA UFM Constantine).

Examineur : R. ALATOU (Maître de Conférences A - UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

Je voudrais dire par ces mots qu'il m'est sincèrement difficile de trouver les expressions adéquates pour dire MERCI à toutes les personnes qui m'ont apportée une quelconque aide en relation avec le travail de mon mémoire de Master.

Merci à mon encadreur, le Professeur **HAMIDECHI M. A.** pour avoir suivi ce travail et l'avoir orienté afin d'aboutir à cette quantité d'enseignements théoriques et pratiques

Je remercie infiniment les honorables membres du jury :

Mr BENHIZIA Y. l'enseignant exemplaire, sincère dans son enseignement. Nous avons énormément profité de vos conseils et apprentissages. Merci pour avoir présider cet honorable jury.

Mr Gagoua M., Maître de Conférences à l'INATAA qui nous a bien encadré durant le mois de stage au sein de son laboratoire à l'INATAA. Merci pour nous avoir appris tant de choses, pour votre dévouement à nous apprendre toute la technique SDS-PAGE et ses documentations.

Mme ALATOU R., maître de conférences A pour avoir accepté d'examiner ce jury. Merci également pour nous avoir si bien enseigné et bien conseillé.

Je n'oublierai jamais de remercier tous mes
enseignants d'écologie microbienne à leur tête le
Professeur Benguedouar A. Qu'il trouve ici ma
meilleure reconnaissance.

Un vif remerciement pour l'équipe du laboratoire, en particulier **Mme Zoghmar S.** pour son aimable et respectueux accueil. Elle nous a offert toutes les aides possibles afin de bien avancer dans notre travail de mémoire. Nous vous disons Merci Madame pour cette aide très précieuse et riche d'enseignements.

Nous remercions également Mrs **Bennouar F., Laraba D. E.** et **Boufrioua A.** pour nous avoir bien encadrer et donné tous les réactifs et matériels indispensables à la bonne pratique durant toute la période de notre travail de mémoire.

Table des matières

Remerciements.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Liste des photos.....	iv
Liste des annexes.....	v
Liste des abréviations et acronymes.....	vi

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction.....	1
1. Profil microbiologique de <i>Staphylococcus</i>	2
1.1 Description du genre <i>Staphylococcus</i>	2
1.2 Taxinomie (ou Taxonomie).....	2
1.3 Pathologie bovine.....	5
2. ARN non codants chez les procaryotes.....	6
2.1 Les sRNA ou "small RNA".....	7
2.2 Les ARN antisens ou "ARNas".....	7
2.3 Les nanoARN.....	7
2.4 Les ARNr ou ARN ribosomiques.....	8
2.4.1 ARN 16S.....	10
3. Structure des ARN.....	13
3.1 Structure primaire.....	13
3.2 Structure secondaire 2d.....	13
3.3 Les pseudo-nòuds.....	14
4. Représentation des structures secondaires.....	15
4.1 Prédiction des structures 2d des ARN.....	18

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel.....	20
1. Echantillonnage.....	20
2. Outils bioinformatiques.....	20
B. Méthodes.....	21
1. Analyse microbiologique.....	21
2. Caractérisation bactérienne.....	21
2.1 Etude des caractères morphologiques.....	21
2.2 Métabolisme glucidique.....	22
2.3 Etude des enzymes respiratoires terminales.....	22
2.4 Métabolisme protéique.....	22
3. Analyse protéomique des isolats bactériens.....	22
3.1 Extraction et précipitation des protéines bactériennes.....	22
3.2 Electrophorèse "SDS-PAGE".....	23
4. Analyse biomoléculaire par séquençage rRNA 16S.....	27
5. Analyse bioinformatique des séquences 16S.....	28
5.1 Analyse thermodynamique de la structure secondaire des ARNr 16S.....	28
5.2 Analyse phylogénétique des isolats.....	29

RESULTATS

1. Analyse microbiologique des souches bactériennes.....	30
1.1 Caractérisation bactériennes.....	30
1.1.1 Les caractères biochimiques.....	31
1.1.2 Les caractères physiologiques.....	32
2. Analyse protéomique des isolats bactériens.....	33
3. Analyse bioinformatique des séquences 16S des isolats.....	33
3.1 Résultats Blast.....	33

3.2 Prédiction structurale secondaire et énergie libre des ARNr 16S.....	34
3.3 Analyse phylogénétique des isolats.....	36
DISCUSSION GENERALE.....	38
CONCLUSION.....	39
Références bibliographiques.....	40
Annexes	
Résumés	

Listes des figures

Figure 1 : La classification hiérarchique du *PHYLUM XIII* (Firmicutes) basée sur l'analyse phylogénétiques de l'ADN/ARN 16S

Figure 2 : Différents ARN chez les procaryotes

Figure 3 : Structure du ribosome procaryote et de ses sous-unités S23, S16 et S5

Figure 4 : Représentation schématique de l'opéron *rnm* chez les procaryotes

Figure 5 : Exemple d'une représentation schématique du gène ARNr 16S

Figure 6 : Exemple d'un pseudo-nœud

Figure 7 : Représentation en arc de la structure 2d d'une portion d'ARN

Figure 8 : Topologie des différents motifs de la structure secondaire d'un ARN

Figure 9 : Naissance des interactions entre les nucléotides pour former la structure 2d ayant le minimum d'énergie libre

Figure 10 : Etapes préliminaires pour extraction de l'ADN bactérien

Figure 11 : Profil électrophorétique des deux souches S1 et S2

Figure 12 : Phylogramme construit selon le modèle de Kimura à deux paramètres

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les amorces les plus fréquemment utilisées et leurs séquences

Tableau 2 : Énergie d'empilement de paires de base (kcal/mole à 37°C)

Tableau 3 : Énergie de déstabilisation pour les autres boucles (kcal/mole à 37°C)

Tableau 4 : Volumes des composants ajoutés pour préparer le gel de séparation

Tableau 5 : Volumes des composants ajoutés pour préparer le gel de concentration

Tableau 6 : Résultats des caractères phénotypiques des deux isolats

Tableau 7 : Aspects macro et microscopiques des isolats

Tableau 8 : Résultats de l'identification des séquences 16S par Blast

Tableau 9 : Structures secondaires d'ARNr 16S et l'énergie libre des souches identifiées

Liste des photos

Photo 1 : Interface du site Internet de RNA fold web server

Photo 2 : Interface principale du Portail MobyLe

Photo 3 : Interface de Mega 5.2

Photo 4 : Aspect du gélose Chapman avec fermentation du mannitol de l'isolat S1

Liste des annexes

Annexe 1 : Séquence 16S de *Staphylococcus haemolyticus* en format EMBL

Annexe 2 : Séquence 16S de *Staphylococcus haemolyticus* en format Vienna

Annexe 3 : Séquence 16S de *Macrococcus brunensis* en format EMBL

Annexe 4 : Séquence 16S de *Macrococcus brunensis* en format Vienna

Annexe 5 : Séquence 16S de *Staphylococcus cohnii* en format EMBL

Annexe 6 : Séquence 16S de *Staphylococcus cohnii* en format Vienna

Annexe 7 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format EMBL

Annexe 8 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format Vienna

Annexe 9 : Séquence 16S de *Staphylococcus haemolyticus* en format EMBL

Annexe 10 : Séquence 16S de *Staphylococcus haemolyticus* en format Vienna

Annexe 11 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format EMBL

Annexe 12 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format Vienna

Annexe 13 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format EMBL

Annexe 14 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format Vienna

Annexe 15 : Séquence 16S de *Staphylococcus saprophyticus* en format EMBL

Annexe 16 : Séquence 16S de *Staphylococcus saprophyticus* en format Vienna

Annexe 17 : Séquence 16S de *Staphylococcus haemolyticus* en format EMBL

Annexe 18 : Séquence 16S de *Staphylococcus haemolyticus* en format Vienna

Annexe 19 : Séquence 16S de *Staphylococcus equorum* en format EMBL

Annexe 20 : Séquence 16S de *Staphylococcus equorum* en format Vienna

Annexe 21 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format EMBL

Annexe 22 : Séquence 16S de *Staphylococcus hominis* en format Vienna

Annexe 23 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus haemolyticus*

Annexe 24 : Structure secondaire 2D 16S de *Macrocooccus brunensis*

Annexe 25 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus cohnii*

Annexe 26 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis*

Annexe 27 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus haemolyticus*

Annexe 28 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis*

Annexe 29 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis*

Annexe 30 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus saprophyticus*

Annexe 31 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus haemolyticus*

Annexe 32 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus equorum*

Annexe 33 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis*

Annexe 34 : Concentration initiale d'ammonium Sulfate

Liste des abréviations et acronymes

ADH : Arginine DiHydrolase

ADNr 16S : ADN Ribosomale 16S

APS : Ammonium Persulfate

ARNas : ARN Anti Sens

ARNnc : ARN Non Codant

ARNr 16S : ARN Ribosomale 16S

BN : Bouillon Nutritif

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique

EMBL : *European Molecular Biology Laboratory*

LDC : Lysine Décarboxylase

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ODC : Ornithine décarboxylase

RPM : Rotation Par Minute

S : Svedberg

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

sRNA : Small RNA

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SCP : Staphylocoques à Coagulase Positive

TEMED : Tetramethylethylenediamine

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

INTRODUCTION

Les enquêtes épidémiologiques dans le secteur agrovétérinaire ont pour objectif de dépister la source microbienne dans les meilleurs délais et surtout d'arriver à bien diagnostiquer le germe en cause. Ce qui constitue en soi, un défi microbiologique.

Les méthodes classiques dont les tests enzymatiques mettent du temps à identifier les germes pathogènes et un risque de propagation au sein de la population est majeur (Bascomb, 1998).

Actuellement, il existe beaucoup de techniques en relation avec l'avancée de la biologie moléculaire RT-PCR, Hybridations moléculaire, MALDI SM, séquençage à haut débit, métagénomique, etc. Leur utilisation apporte une aide précieuse aux microbiologistes surtout dans le cas des bactéries exigeantes voire non cultivables (Chakravorty, 2007). De plus la longue manipulation par voie classique augmente le risqué de contamination voire d'infection par le pathogène (Denis, 2007).

L'entrée en seine de l'analyse bioinformatique des séquences géniques devient de plus en plus indispensable, car elle apporte des éléments d'informations nécessaires qui aident à la décision dans le diagnostic bactérien. Elle devient une méthode de contrôle microbiologique dans la filière agrovétérinaire (boutet, 2005).

Dans le cas de notre étude, nous avons posé les objectifs suivants :

- Estimer l'incidence de *Staphylococcus sp.* Au sein des vaches des wilaya de Batna, Mila et Constantine,
- Utiliser l'ARNr 16S pour un diagnostic bactérien plus précis, via la prédiction de structure 2D.

Ce travail entre dans le cadre d'une thèse de Doctorat réalisée au sein de la faculté SNV, Université des Frères Mentouri Constantine.

1. Profil microbiologique de *Staphylococcus*

1.1 Description du genre *Staphylococcus*

L'étude comparative des séquences d'ADNr 16S (Ludwig *et al.*, 1981) et d'hybridation ADN-ADN (Kloos et Schleifer, 1986), montrent que *Staphylococcus* est un groupe monophylétique. Il appartient à la famille des *Staphylococcaceae* (Garrity et Holt, 2001). Phylogénétiquement, il est relié à la branche "*Clostridium, Bacillus, Streptococcus*" (Stackebrandt *et al.*, 1997). Phénotypiquement, les staphylocoques sont à Gram positif, groupés en amas, mesurent de 0,8 à 1µm, immobiles, non sporulés, catalase positive, non capsulés et halo-tolérants. La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à l'exception de *S.sacchrotyticus* et *S.aureus* subsp. *anaerobius* qui sont anaérobies strictes.

De nombreux tests phénotypiques permettent de distinguer les espèces du genre *Staphylococcus* des autres genres à Gram positif. Cette distinction est importante entre les genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*, du fait de leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques proches et des niches écologiques qu'ils ont en commun. Selon le dictionnaire de bactériologie vétérinaire (Euzéby, 1997; LPSN 2015), le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 52 espèces et sous-espèces. Les espèces les plus caractéristiques du genre sont les SCP et SCN. Les SCN sont habituellement commensales de la peau ou saprophytes mais leur pouvoir pathogène est loin d'être totalement négligeable (Nauciel, 2000). Les SCN, longtemps considérés comme peu ou pas pathogènes, sont reconnus comme bactéries pathogènes opportunistes, notamment les espèces *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* et *S.saprophyticus* (Denis *et al.*, 2007).

1.2 Taxinomie (ou Taxonomie)

Les staphylocoques ont été mis en évidence pour la première fois en 1878 dans le pus d'abcès par Koch en Allemagne. La dénomination de *Staphylococcus* a été introduite en 1883 par Ogston et provient de l'association des termes grecs *staphylé*, grappe de raisin et *kokkos*, grain. Rosenbach fut le premier, en 1884, à décrire leurs caractères culturels. La classification des staphylocoques a connu de nombreux bouleversements.

Lors de la première édition en 1923 du "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*", les staphylocoques étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae*, puis lors de la deuxième édition en 1926, dans la famille des *Micrococcaceae*.

Ce n'est qu'en 1957 que les staphylocoques et les microcoques furent séparés sur la base de leur capacité à utiliser le glucose en anaérobiose. Cependant, ce test amena beaucoup de confusion en attribuant certaines espèces du genre *Staphylococcus* au genre *Micrococcus* (Baird-Parker, 1971 ; Pulverer *et al.*, 1987). En 1974, avec le début de la biologie moléculaire, Baird-Parker sépare définitivement le genre *Staphylococcus* du genre *Micrococcus*, grâce à la différence du contenu en guanine et en cytosine de leur ADN: 66-75% pour *Micrococcus* et 30-39% pour *Staphylococcus* (Bascomb et Manafi, 1998).

Avec l'évolution des techniques génomiques, le genre *Staphylococcus* a été reclassé avec les bactéries à Gram positif dont l'ADN présente un GC% inférieur à 55. Le GC% et la composition de la paroi sont des marqueurs robustes pour séparer le genre *Staphylococcus* des autres coques à Gram positif et à catalase positive. Ainsi, la famille des *Micrococcaceae* a été remaniée et dans la seconde édition du "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*", le genre *Staphylococcus* a été reclassé dans l'ordre des *Bacillales* et dans la famille des *Staphylococcaceae*.

Le genre *Staphylococcus* devient taxonomiquement proche des genres *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Planococcus*. Selon la classification de Garrity *et al.*, (2007) ; Le *phylum* Firmicutes (figure 1) est constitué de quatre classes : *Clostridia*, *Mollicutes*, *Bacilli*, *Togobacteria*. La classe des *Bacilli* est constituée de deux ordres: *Bacillales* et *Lactobacillales*, dont chacun est divisé en quatre familles. *Staphylococcaceae* constitue la quatrième famille des *Bacillales* et comprend un seul genre : *Staphylococcus*(GC% 30-39).

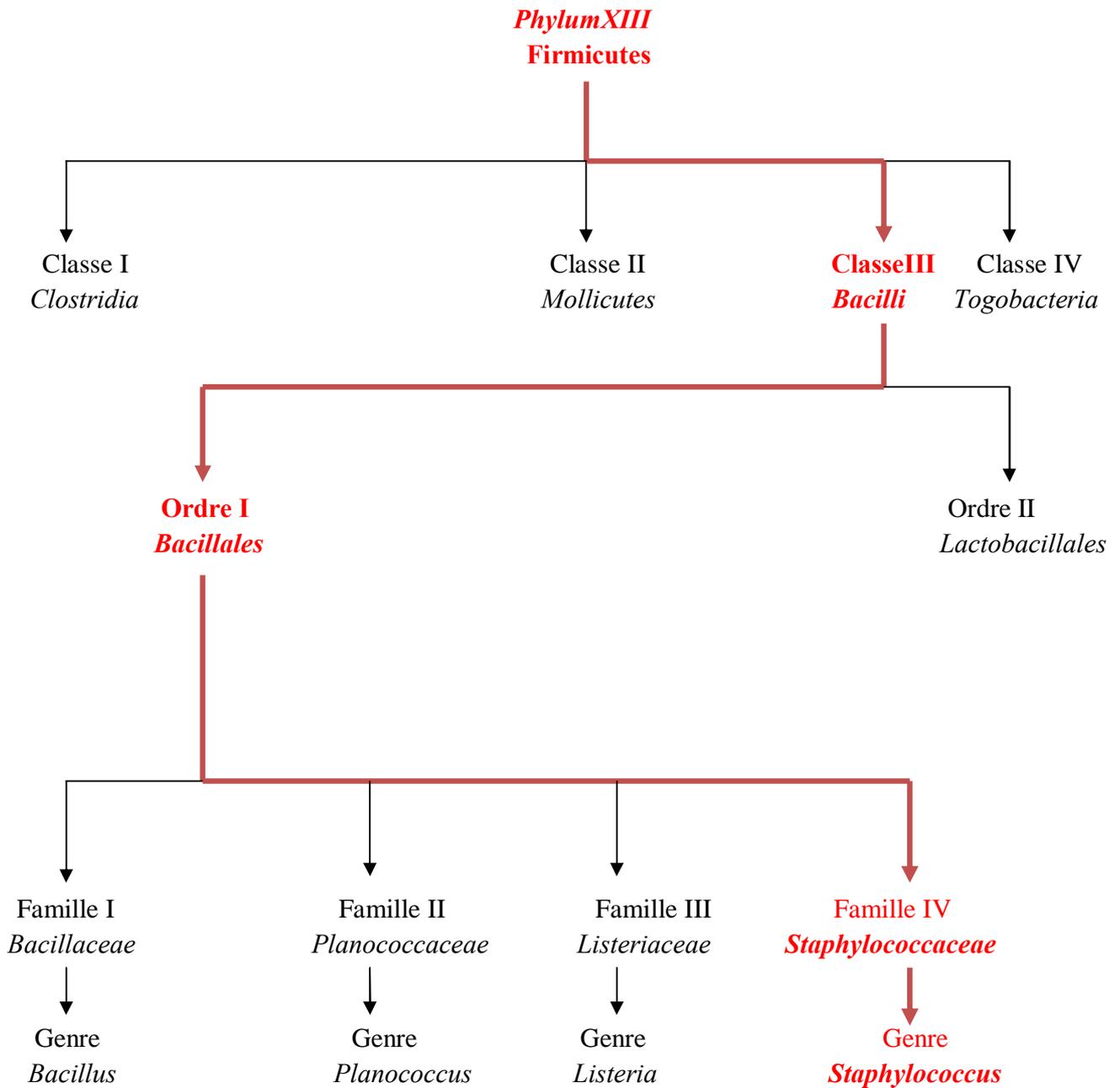


Figure 1: La classification hiérarchique du *Phylum XIII* (Firmicutes) basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADN/ ARN 16S (Garrity *et al.*, 2007)

1.3 Pathologie bovine

Les staphylocoques sont des agents pathogènes opportunistes très répandus dans la nature qui produisent plusieurs types de toxines, les hémolysines. A la suite d'un traumatisme localisé, ces bactéries provoquent des folliculites. Les localisations lésionnelles les plus fréquentes se rencontrent essentiellement à la base de la queue, sur la croupe ou dans la région périanale d'une part, sur la mamelle et le trayon d'autre part. On observe aussi des affections généralisées au corps entier. Les animaux affectés sont généralement en bonne santé et la maladie n'entraîne aucune chute de production.

Au niveau de la mamelle et du trayon, on peut observer trois entités :

- La dermatite pustuleuse, dans laquelle la lésion localisée à l'épiderme, ne se rencontre généralement que sur les trayons.
- La folliculite, dans laquelle le staphylocoque pénètre à travers le follicule du poil, provoquant une infection localisée qui n'intéresse pas le derme. Les lésions se rencontrent donc sur la peau de la mamelle.
- La furonculose qui concerne les poils et les glandes sébacées et, de ce fait, derme et hypoderme, et qui se localise à la base du pis, voire plus rarement, entre les quartiers.

Ces lésions sont toutes douloureuses et peuvent provoquer une rétention lactée, à l'origine de mammites subaiguës ou chroniques.

Chez les bovins, la folliculite et la furonculose staphylococciques sont souvent liées à de mauvaises conditions d'hygiène et, parfois, à un mauvais état général de l'animal.

La peau, les narines et l'oropharynx d'animaux sains sont fréquemment colonisés par ce germe. La pénétration transcutanée et la production de lésions cutanées dépendent de nombreux facteurs, parmi lesquels la macération, les traumatismes, l'état immunitaire de l'animal et la disparition de la flore bactérienne normale.

L'infection s'installe habituellement à la suite d'une blessure cutanée localisée chez des animaux vraisemblablement affaiblis et maintenus dans des conditions d'humidité excessive ou de mauvaise hygiène. L'affection est transmissible à l'homme (Gourreau et Bendali, 2008).

Les souches de *S.aureus* virulentes produisent de nombreuses enzymes extracellulaires ou des toxines. Au moins quatre types différents d'hémolysines sont connus. Une même souche pouvant en produire plusieurs. La production d'hémolysines est responsable des zones d'hémolyse visibles autour des colonies de staphylocoques, après culture sur gélose au sang (Madigan et Martinko, 2007).

2. ARN non codants chez les procaryotes

Un ARN non codant est un ARN issu de la transcription de l'ADN, mais qui ne sera pas traduit en protéine. L'importance quantitative et fonctionnelle des ARN non codants a été longtemps sous estimée. On en connaît aujourd'hui une grande diversité (figure 2), et il semble qu'une partie importante des génomes soit transcrite en ARNnc (Dumas, 2012).

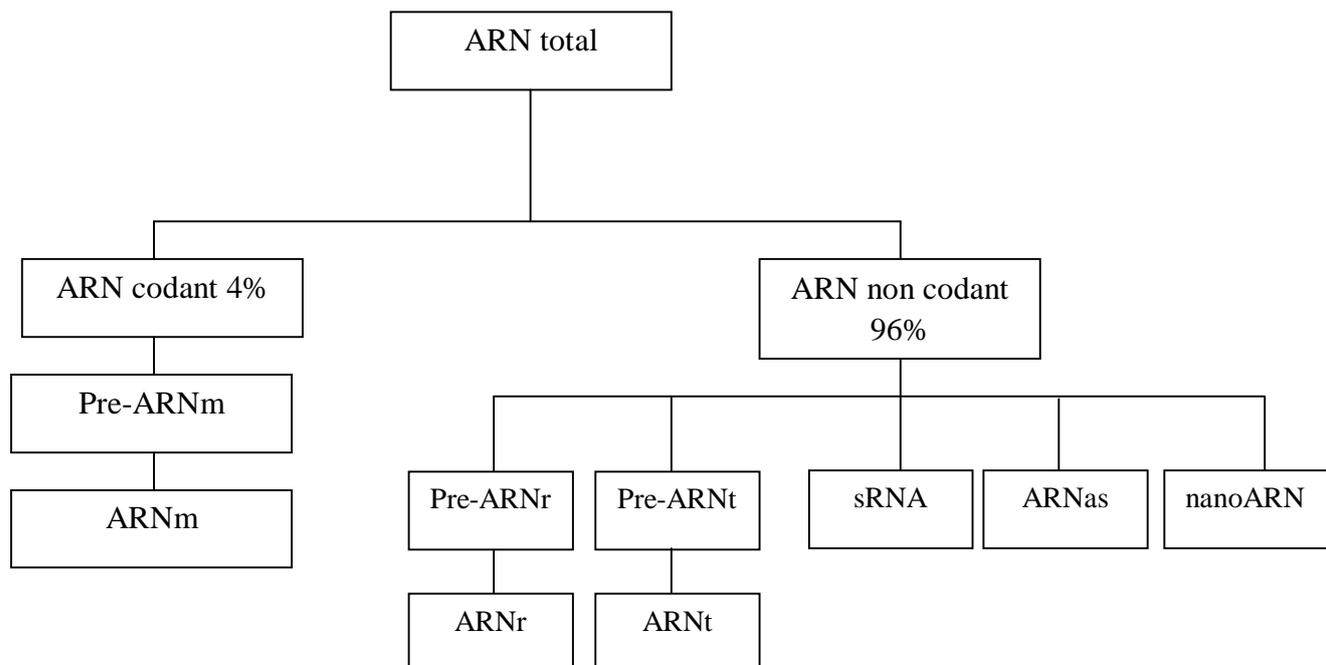


Figure 2 : Différents ARN chez les procaryotes

2.1 Les sRNA ou "small RNA"

La découverte des sRNA connaît un essor fulgurant depuis 2001 grâce à l'amélioration des techniques prédictives combinés à des tests d'expression *in vivo* (Wassarman *et al.*, 2001 ; Argaman *et al.*, 2001 ; Rivas *et al.*, 2001).

Les sRNA régulent la traduction et la dégradation des ARNm. Ils s'apparient avec des séquences complémentaires des ARNm cibles et entraînent une inhibition de la traduction de l'ARNm. Les sARN sont plus grand (80-110 nucléotides) que leurs équivalents fonctionnels chez les eucaryotes "ARNi" et "miARN" (21-30 nucléotides) (Watson *et al.*, 2012).

2.2 Les ARN antisens ou "ARNas"

L'importance de la régulation par les ARNas a été mise à jour grâce à l'essor des techniques de séquençage à haut débit (Sharma *et al.*, 2010) et des puces à ADN couvrant les deux brins du génome (Georg *et al.*, 2009 ; Güellet *et al.*, 2009 ; Toledo-arana *et al.*, 2009). Ces avancées technologiques ont mis en évidence l'existence d'une transcription d'ARN antisens (ARNas) chez les bactéries. Depuis, la transcription d'ARNas a été retrouvée dans plusieurs génomes bactériens (Georg et Hess, 2011 ; Gottesman et Storz, 2011), et des études récentes menées chez *Staphylococcus aureus* (Lasa *et al.*, 2011 ; Lioliou *et al.*, 2012) montrent qu'une transcription antisens est retrouvée sur presque l'ensemble des deux brins d'ADN.

2.3 Les nano ARN

Les nanoARN ont un rôle clé comme initiateurs de la transcription. Cette voie alternative d'initiation de la transcription a été mise en évidence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Goldman *et al.*, 2011). Il a été montré que l'ARN polymérase de la bactérie était capable d'initier la transcription à partir de nanoARN de 2 à 4 nucléotides. Dans un contexte normal, ces nanoARN sont dégradés par l'enzyme oligoribonucléase qui joue un rôle crucial dans la dégradation des ARN chez les bactéries à Gram négatif.

L'inhibition de cette enzyme chez *P.aeruginosa* entraîne l'accumulation des nanoARN qui servent alors d'amorce à l'ARN polymérase pour initier la transcription des gènes. L'utilisation des nanoARN comme amorce influencerait l'efficacité d'initiation de la transcription, et le niveau des ARN transcrits (Goldman *et al.*, 2011).

2.4 Les ARNr ou ARN ribosomiques

Les ARNr possèdent plusieurs caractéristiques qui en font d'excellents indicateurs de l'évolution moléculaire des espèces bactériennes. Ils sont universellement distribués et contiennent plusieurs régions dans lesquelles la séquence nucléotidique est fortement conservée.

Il existe trois molécules d'ARNr différentes qui ont, chez les procaryotes, les tailles de 5S, 16S et 23S (S étant l'unité de masse de Svedberg fondée sur la sédimentation de la molécule). Le ribosome des procaryotes est formé de deux sous-unités : la petite sous-unité (30S) est composée de l'ARNr 16S (codé par un gène d'environ 1500 nucléotides) et 21 protéines, la grande sous-unité (50S) contient respectivement deux ARNr différents, 23S (codé par un gène d'environ 2900 nucléotides) et 5S (codé par un gène d'environ 120 nucléotides) et 31 protéines (Mears *et al.*, 2002 ; Schmeing et Ramakrishnan, 2009) (figure3). Ces ARNr jouent un rôle essentiel dans la structure et le maintien de l'intégrité des ribosomes, en association avec les protéines ribosomales (Schneider *et al.*, 2003).

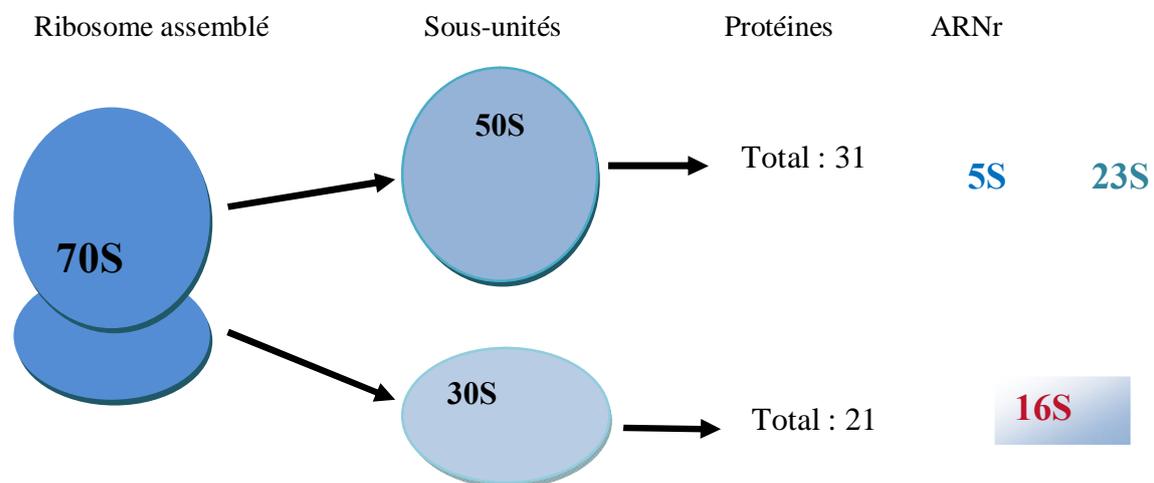


Figure 3 : Structure du ribosome procaryote et de ses sous-unités S23, S16 et S5 (Madigan et Martinko., 2007)

Les gènes codant pour les ARNr des bactéries sont organisés en opéron, appelé "Opéron *rrn*", localisé sur le chromosome bactérien (Watson *et al.*, 1987 ; Gürtler et Stanisich, 1996 ; Garcia-Martinez *et al.*, 1996) (figure 4). Sa structure est semblable chez toutes les bactéries, de 1 à 11 copies de l'opéron sont présentes dans les différentes espèces bactériennes (Gürtler, 1993 ; Garcia-Martinez *et al.*, 1996).

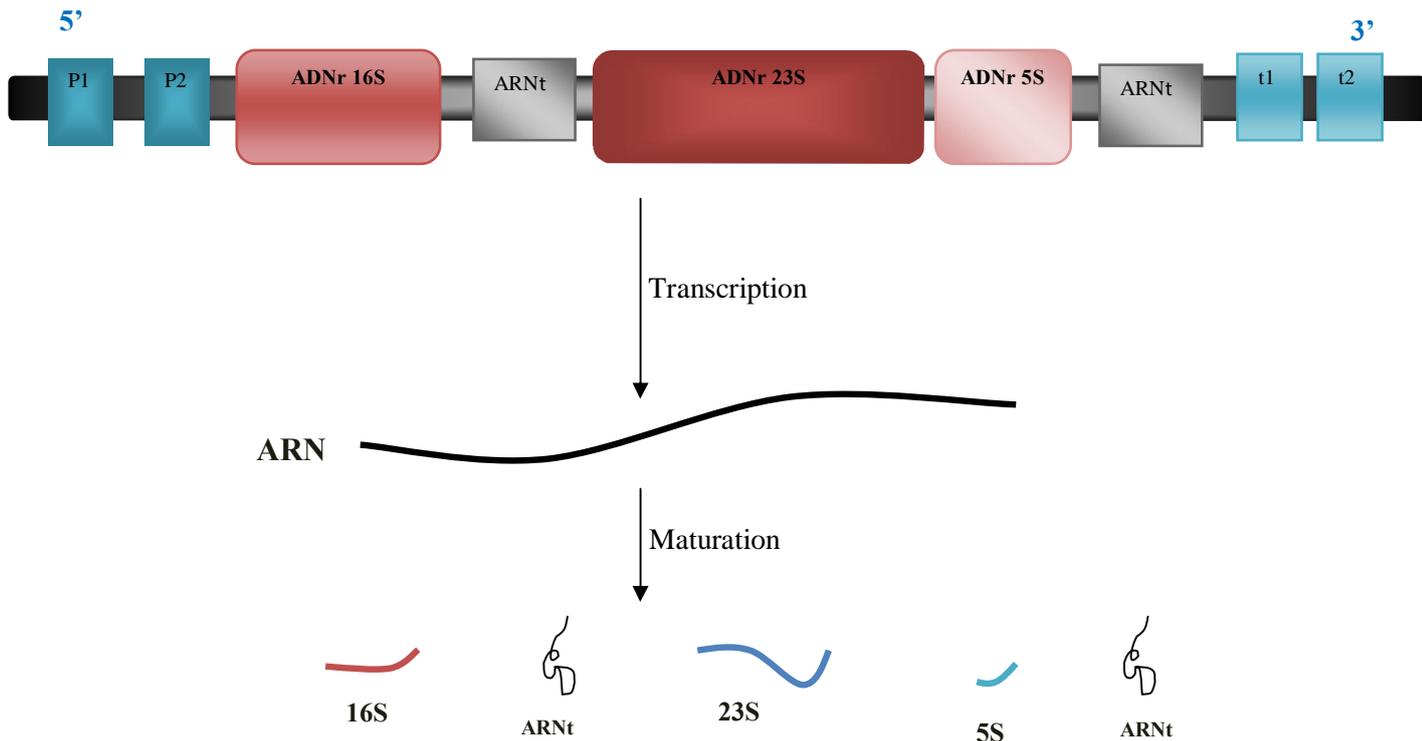


Figure 4 : Représentation schématique de l'opéron *rrn* chez les procaryotes (Garcia-Martinez *et al.*, 1996)

P1 : Promoteur; P2: Opérateur ; t1, t2 : Termineurs.

Les gènes ribosomaux sont présents chez tous les organismes, et possèdent la même fonction vitale "synthèse des protéique". Ces caractéristiques font des ribosomes d'excellents candidats d'études pour les taxonomistes. Ces molécules possèdent un niveau d'évolution assez élevé pour assurer une variabilité entre les différentes espèces ; mais avec un degré de conservation suffisant pour assurer que ces différences correspondent à des catégories taxonomiques stables comme les genres et les espèces.

Parmi tous les ARN ribosomiaux, seul le gène ARNr 16S remplit ces deux caractéristiques ; le gène ARNr 23S est extrêmement conservé alors que le gène ARNr 5S est trop petit (Peix *et al.*, 2009). C'est pourquoi le gène ARNr 16S est devenu la molécule clé sur laquelle sont basés les efforts de séquençage et la classification des procaryotes (Anzaïet *al.*, 2000 ; Palleroni, 2005 ; Madigan et Martinko., 2007).

Sur le plan bioinformatique, il existe plusieurs bases de données de séquences d'ARNr. Par exemple, le projet RDP (*Ribosomal Database Project*) contient une collection de plus de 100 000 avec des informations phylogénétiques, des références bibliographiques, des séquences nouvellement établies et de nombreuses autres données (Madigan et Martinko., 2007).

2.4.1 ARNr 16S

Le gène codant pour cet ARNr est le "16S rRNA gene" (Clarridge, 2004) (figure 5), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Petti, 2007; Woese, 1987). Il est constitué de sept régions conservées et neuf hypervariables (Chakravorty *et al.*, 2007). Sa composition en nucléotides hautement conservées aux extrémités 5' et 3' permet l'emploi d'amorces universelles (tableau 1).

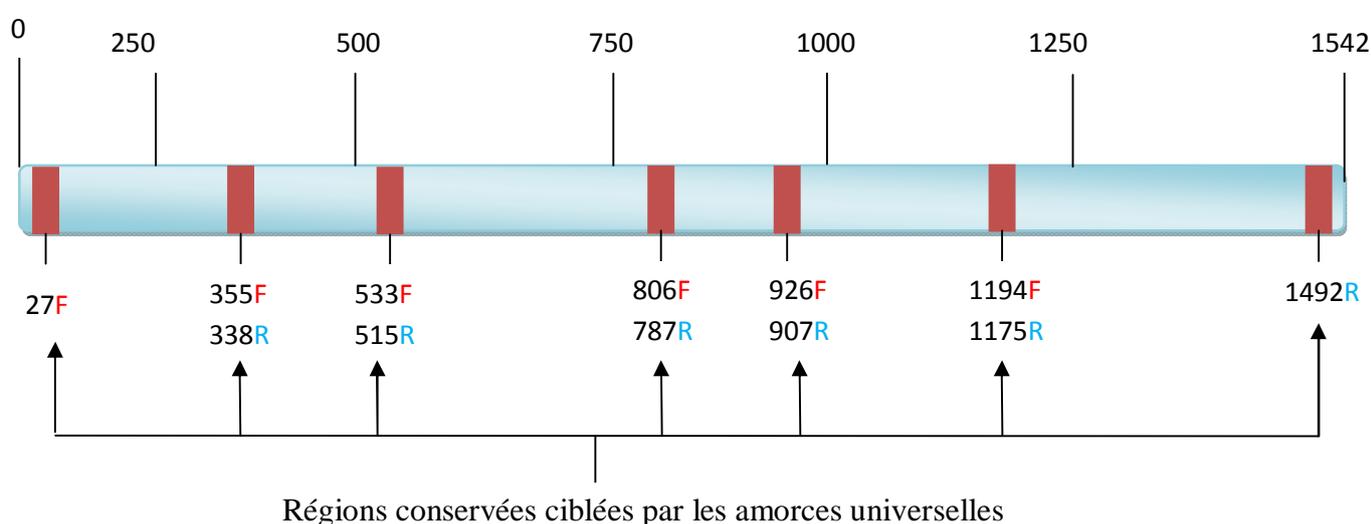


Figure 5 : Exemple d'une représentation schématique du gène ARNr 16S

Les bandes rouges représentent les régions conservées utilisées pour désigner les amorces nécessaires à l'amplification et au séquençage (Petti, 2007).

L'ARNr 16S possède de nombreuses fonctions parmi lesquelles :

- Rôle structural : définissant les positions des protéines ribosomales,
- l'extrémité 3' contient une séquence "anti-Shine-Dalgarno" (AGGAGGUAA) qui se lie en amont du codon AUG (start codon) de l'ARNm.
- interagit avec le 23S, contribuant ainsi à la liaison des deux sous-unités ribosomiques (30S et 50S),
- stabilise l'appariement codon-anticodon sur le site A du ribosome par l'intermédiaire de la formation d'une liaison hydrogène entre l'atome N1 des résidus Adénine 1492 et 1493 et le groupe 2'OH de l'uracine de l'ARNm.

Tableau 1 : Les amorces les plus fréquemment utilisées et leurs séquences

Amorces	Séquences (5'3')	Références
8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Eden P.A. <i>et al.</i> (1991)
U1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	
928F	TAA AAC TYA AAK GAA TTG ACG GG	Weidner S. <i>et al.</i> (1996)
336R	ACT GCT GCSYCC CGT AGG AGT CT	
1100F	YAA CGA GCG CAA CCC	
1100R	GGG TTG CGC TCG TTG	
337F	GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG	
907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	
785F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA	
805R	GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC	
533F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	
518R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G	
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Jiang, H. <i>et al.</i> (2006)
1492R	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	

R (puRines) = A,G ; Y (pYrimidines) = T,C ; K (Keto) = T,G ; M (aMino) = A,C ; S (Strong) = G,C ; W (Weak) = A,T.

Au cours des années 1980, il a été montré que les relations phylogéniques entre les êtres vivants pouvaient être déterminées en comparant leurs séquences nucléiques (Clarridge, 2004). Des travaux préliminaires ont pu montrer que le "16S rRNA gene" code pour un ARN ribosomal de fonction constante dans l'évolution bactérienne.

Les séquences du gène 16S ont ainsi joué un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxinomie bactérienne (Janda et Abbott, 2007; Olsen et Woese, 1993). Ce gène a d'abord été utilisé à la fin des années 1980 par Carl Woese comme outil d'étude de l'évolution bactérienne (Woese, 1987). En 1991, Weisburg *et al.* ont décrit des amorces dites "universelles" permettant d'amplifier l'intégrité du gène codant pour l'ARNr 16S de la plupart des bactéries (Weisburg *et al.*, 1991). En partant de la caractéristique d'universalité dans le monde bactérien, l'amplification suivie du séquençage du "16S rRNA gene" a été utilisée pour identifier des souches bactériennes jusque là, mal identifiées par techniques conventionnelles (Petti, 2007).

Carl Woese et George E. Fox (1977) ont été les premiers à avoir utilisé l'ARNr 16S en phylogénie. Cependant, son utilisation à des fins taxinomiques présente des limites. En effet, malgré sa structure composée d'une alternance de régions variables et très conservées, le nombre de substitutions nucléotidiques est trop faible pour permettre une analyse phylogénétique entre des espèces très proches (Garcia-Martinez *et al.*, 1999 ; Kolbert et Persing, 1999). Pour pallier cette insuffisance, en plus de l'analyse du gène ADNr 16S, il existe d'autres marqueurs phylogénétiques tels que les régions ITS, présentant une grande variabilité tant du point de vue taille que séquence ; ce qui permet une distinction entre des espèces phylogénétiquement très proches (Gürtler et Stanisich, 1996), ainsi que les "gènes de ménage".

Actuellement, avec les avancées technologiques en terme de séquençage et l'existence de bases de données accessibles via Internet, des séquences de nombreuses espèces, le séquençage est utilisé de façon routinière en taxinomie et il est recommandé pour la souche type d'une nouvelle espèce (Stackebrandt *et al.*, 2002). Il est admis qu'en dessous de 97% d'homologie deux bactéries ne peuvent appartenir à la même espèce (Marchandin *et al.*, 2003).

Les séquences types de l'ARNr 16S des souches bactériennes sont disponibles sur les bases de données publiques telles que GenBank hébergée sur le portail du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cependant, la qualité de ces séquences n'est pas validée pour la plupart d'entre elles. Par conséquent, les bases de données spécifiques qui recueillent seulement les séquences d'ARNr 16S, sont plus fiables.

Les bases de données les plus utilisées sont :

1. EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>),
2. RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>),
3. SILVA (www.arb-silva.de),
4. GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/)
5. Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com>).

3. Structure des ARN

3.1 Structure primaire

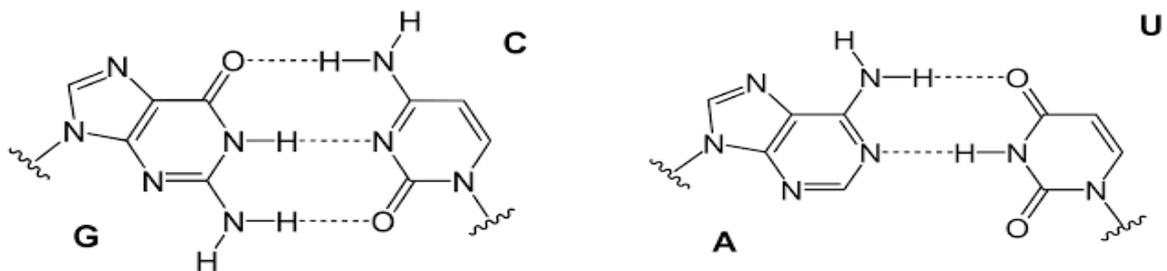
La structure primaire d'un ARN correspond à l'enchaînement (ou succession) des nucléotides constitutifs de la séquence prise dans la direction conventionnelle de 5'~P vers 3'OH. C'est un brin monocaténaire qui se replie sur lui-même pour adopter plusieurs conformations possibles intramoléculaires dans l'espace cellulaire (Bouard, 2016).

3.2 Structure secondaire 2d

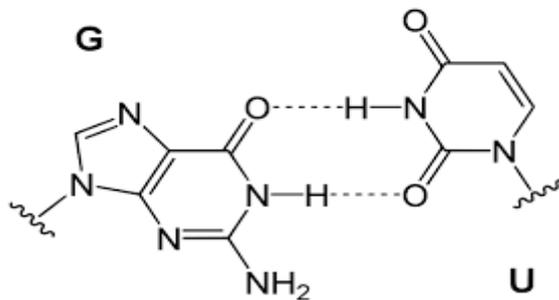
L'ARN, sous forme simple brin, se replie sur lui-même et des interactions fortes se créent entre nucléotides ; ce qui conduit à la formation de régions complémentaires. Cette topologie des appariements constitue ce qu'on appelle la structure secondaire de l'ARN (Doty *et al.*, 1959). Cette structure est due aux différents appariements internes entre les bases complémentaires grâce aux liaisons Hydrogène (Bouard, 2016).

Plusieurs types d'appariements peuvent être rencontrés dans la structure 2d des ARN (Lemieux et Major, 2002 ; Leontis et Westhof, 2001) :

- Appariements Watson-Crick (ou liaisons canoniques) sont les liaisons majoritaires. Se font entre A et U et entre C et G (A=U et G=C) :



- Les liaisons de Wobble entre G et U, plus faibles que celles de Watson-Crick. Ces liaisons sont dites non-canoniques :



- D'autres liaisons plus rares telles que les liaisons G-A (Noller, 1984) et les liaisons C-U (Holbrook *et al.*, 1991).

3.3 Les pseudo-nœuds

Les pseudo-nœuds sont des liaisons entre des nucléotides non appariés dans aucun élément de la structure secondaire (Saenger, 1984) (figure 6).

Un pseudo-nœud se forme à partir d'une structure en tige et boucle, lorsque des nucléotides de la boucle s'apparient avec une autre région de l'ARN situé à l'extérieur de la tige (Staple et Butcher, 2005).

Il en résulte une structure avec deux hélices dans laquelle un seul des brins d'une des hélices correspond à une région située entre les deux segments correspondant aux brins de l'autre hélice (Rietveld *et al.*, 1982).

On les appelle des pseudo-nœuds, car l'enlacement de structures auquel ils donnent naissance ne correspond pas à un nœud, au sens topologique du terme : si on "tire" sur les deux extrémités de l'ARN, la structure se défait. Ceci impose une contrainte sur les pseudo-nœuds : ils sont forcément de taille limitée, la plus courte des deux hélices ne pouvant dépasser neuf à dix paires de bases. Au-delà, le pas de l'hélice d'ARN étant de 10 à 11 paires de bases par tour, l'enlacement des brins du duplex conduit à la formation d'un véritable nœud au sens topologique.

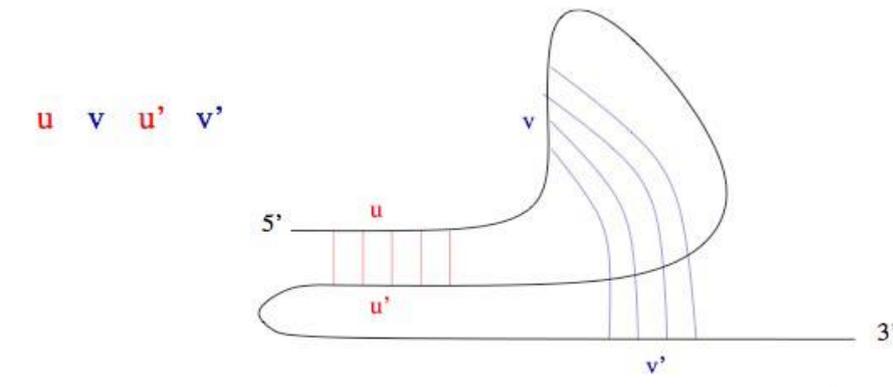


Figure 6 : Exemple d'un pseudo-nœud : les liaisons qui forment le pseudo-nœud sont dans les régions v et v'

4. Représentation des structures secondaires

La représentation graphique des structures 2d des ARN peut se faire de plus d'une manière. Elle peut être représentée par :

a- des diagrammes en arcs (figure 7) où la séquence est écrite sur une ligne et où les paires de bases sont matérialisées par des arcs tracés au-dessus :

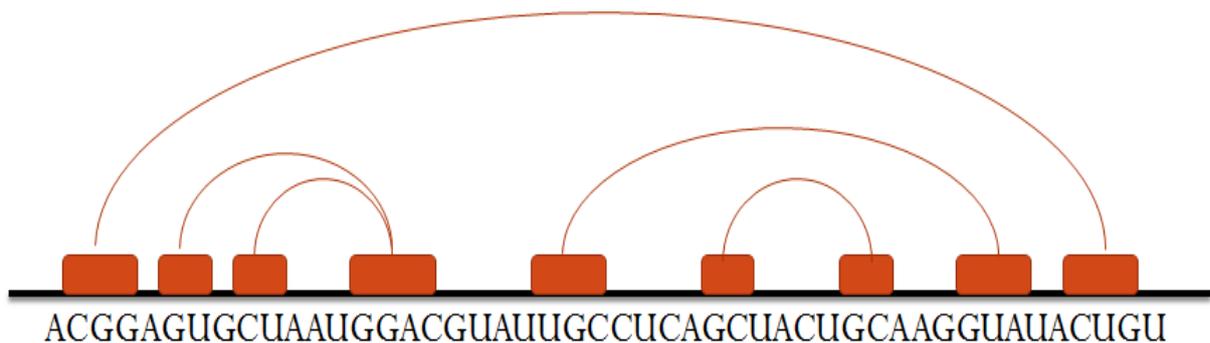


Figure 7 : Représentation en arc de la structure 2d d'une portion d'ARN

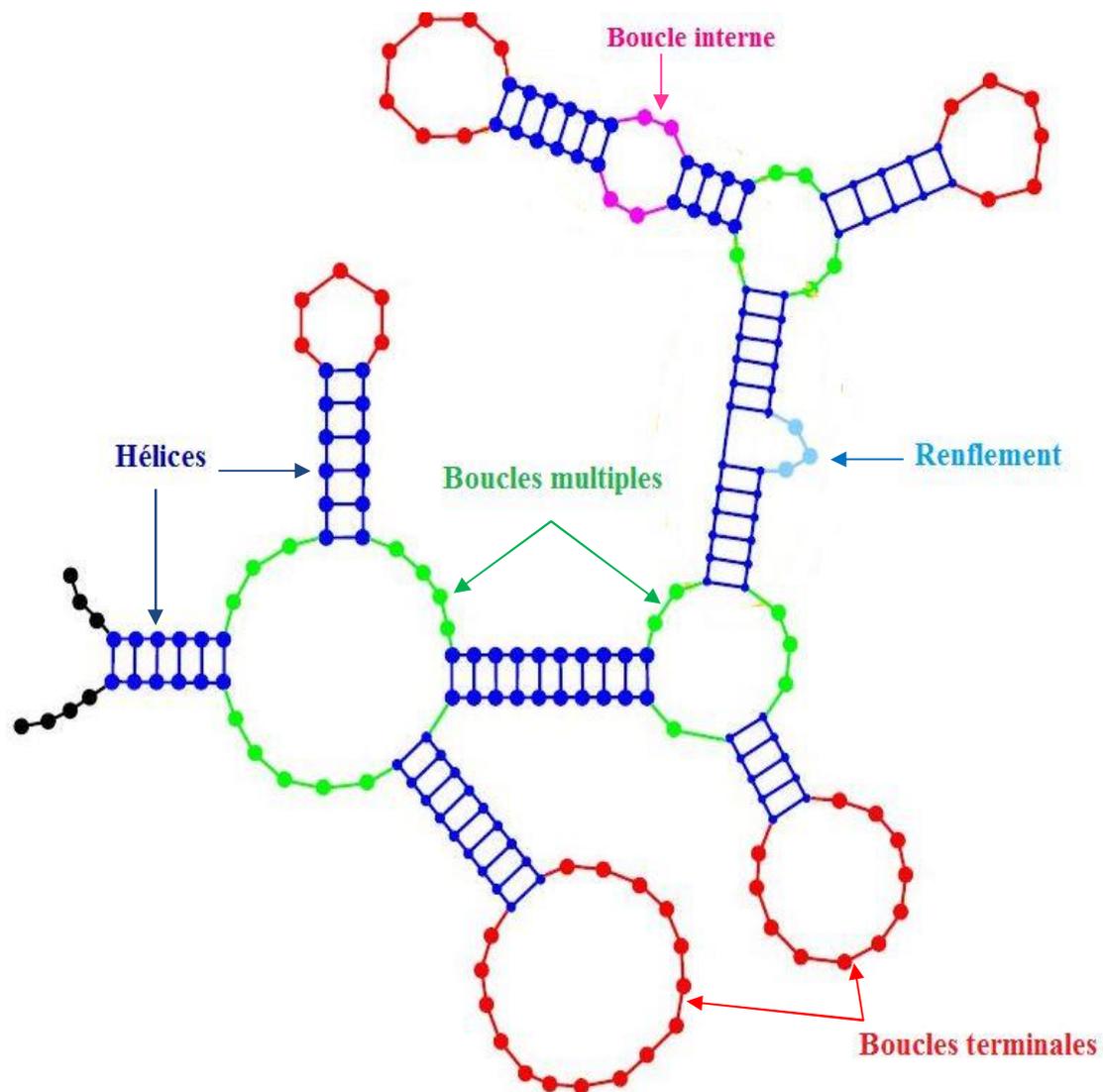


Figure 8 : Topologie des différents motifs de la structure secondaire d'un ARN

4.1 Prédiction des structures 2d des ARN

Un bon nombre de méthodes permettent de prédire la structure 2d d'une molécule d'ARN. Mais deux principales méthodes de prédiction de structure sont les plus employées pour des fins d'annotation :

- a. Analyse comparative des séquences / Analyse de covariation : prend en compte les modèles de paires de bases conservés durant l'évolution moléculaire des séquences, car celles-ci varient en même temps au cours de l'évolution tout en maintenant l'intégrité structurelle.
- b. Méthode du minimum d'énergie libre (G°): détermine la structure des régions complémentaires qui sont énergétiquement stables. La structure 2d selon cette procédure est la celle avec le minimum d'énergie libre. L'hypothèse fondamentale de cette théorie est que l'énergie de chaque paire de bases est indépendante de toutes les autres paires ; en conséquences de quoi, l'énergie libre totale de toute la molécule est la somme de toutes les énergies des paires de bases. Les programmes (logiciels) les plus performants sont :
 - RNAFold Web Server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)
 - MFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

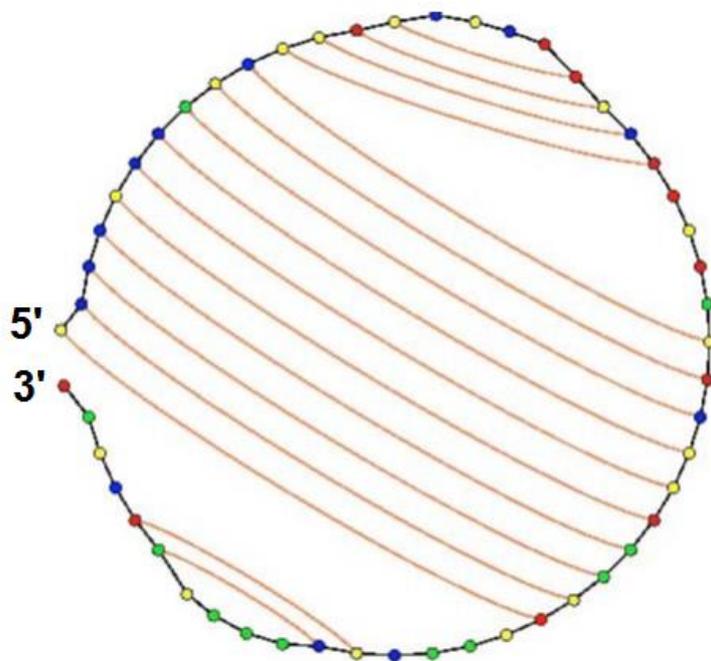


Figure 9 : Naissance des interactions entre les nucléotides pour former la structure 2d ayant le minimum d'énergie libre

L'estimation de l'énergie pour une structure 2d donnée est calculée à la base des valeurs d'énergies standards (tableaux 2 et 3) calculées pour les différentes paires de bases possibles selon Turner, *et al.* (1988).

Tableau 2 : Énergie d'empilement de paires de base (kcal/mole à 37°C) (Turner *et al.*, 1980)

	A/U	C/G	G/C	U/A	G/U	U/G
A/U	-0.9	-1.8	-2.3	-1.1	-1.1	-0.8
C/G	-1.7	-2.9	-3.4	-2.3	-2.1	-1.4
G/C	-2.1	-2.0	-2.9	-1.8	-1.9	-1.2
U/A	-0.9	-1.7	-2.1	-0.9	-1.0	-0.5
G/U	-0.5	-1.2	-1.4	-0.8	-0.4	-0.2
U/G	-1.0	-1.9	-2.1	-1.1	-1.5	-0.4

Tableau 3 : Énergie de déstabilisation pour les autres boucles (kcal/mole à 37°C) (Serra et Turner, 1995)

Nombre de bases	1	5	10	20	30
Boucle interne	-	5.3	6.6	7.0	7.4
Bulge	3.9	4.8	5.5	6.3	6.7
Épingle à cheveux	-	4.4	5.3	6.1	6.5

MATERIEL ET METHODE

A. MATERIEL

1. Echantillonnage

Le prélèvement des échantillons a été effectué sur des abcès de la peau et des mamelles de cinq vaches de race Holstein dans une ferme située à Grarem (Wilaya de Mila) (36, 31° N latitude ; 6,20° E longitude) , en Hiver 2016 en présence d'un Docteur vétérinaire. L'entourage des abcès a été nettoyé afin d'éviter une éventuelle contamination par la flore normale de la peau. Des écouvillons stériles, contenant chacun 0,5 mL de BN, ont servi aux différents prélèvements.

Les écouvillons ayant servi à prélever les vaches ont été analysés au laboratoire de microbiologie au centre universitaire de Mila ; lequel nous a aimablement fourni deux souches supposées staphylococciques pathogènes parmi les cinq isolées. Ces deux isolats feront l'objet d'identification au niveau de notre faculté SNV au laboratoire de microbiologie.

Ce travail faisant partie d'une thèse de Doctorat, la candidate Assia G encadrée par le Pr HAMIDECHI nous a confié neuf séquences rRNA 16S isolats staphylococciques pour des prédictions structurelles 2D.

Ces neuf isolats sont géographiquement distribués comme suit :

- Wilaya de Batna : Six souches dont quatre *S. hominis*, une souche *S. cohnii* et une souche *S. haemolyticus*
- Wilaya de Constantine : Trois souches dont *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* et *S. equorum*.

2. Outils bioinformatiques

Des programmes informatiques et des bases de données génomiques ont servi aux différentes analyses des séquences ARN 16S et prédictions des structures secondaires d'ARN 16S :

- Portails bioinformatique NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) et Mobylye (www.Mobylye.Pasteur.fr)
- Logiciel de prédiction des structures secondaires des ARN : RNAFold (<http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)
- Logiciel de phylogénie moléculaire et d'alignements multiples : MEGA 5.2
- Emboss Seqret (http://www.ebi.ac.uk/Tools/sfc/emboss_seqret/)

B. METHODES

1. Analyse microbiologique

- Ensemencements

Les souches fournies dans des tubes Eppendorf (1,5 mL) ont été ensemencées dans des tubes de BN et placées à l'étuve pendant deux heures à 37°C, afin de revivifier et stimuler leur croissance. Une fois la durée écoulée, les isolats ont été ensemencés sur milieu Chapman par la technique des quadrants et incubés 24 heures à 37°C.

- Isolement des souches et purification

Après croissance sur Chapman, des repiquages ont été effectués sur les mêmes types de colonies afin d'obtenir des individus de plus en plus d'aspect homogène, purs et bien isolés.

2. Caractérisation bactérienne

Des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été réalisés pour une caractérisation présomptives des isolats.

2.1 Etude des caractères morphologiques

Cette étude c'est basé sur des observations macroscopiques et microscopiques (Gx100) pour différencier l'aspect des colonies sur boîtes de Pétri, le type de Gram, la forme cellulaire et le mode de regroupement des bactéries.

-Examen macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies sur Chapman a concerné la forme des colonies, leur couleur et l'aspect de leur surface.

- Examen microscopique

L'observation des bactéries a été effectuée au microscope (Gx100) après coloration de Gram selon le protocole de Nicole (1895) :

- Préparer et fixer le frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen,
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1 min et éliminer l'excès par l'eau courante,
- Ajouter le Lugol : deux bains de 4 à 6 secondes et laver l'excès par l'eau courante,
- Traiter au mélange alcool/acétone puis rincer à l'eau,
- Recolorer à la Fuschine pendant 20 secondes puis rincer à l'eau,

- Séchage avec du papier absorbant,
- Observation à l'huile d'immersion.

2.2 Métabolisme glucidique

- Utilisation du Mannitol

2.3 Etude des enzymes respiratoires terminales

- Recherche de l'oxydase
- Recherche de la catalase

2.4 Métabolisme protéique

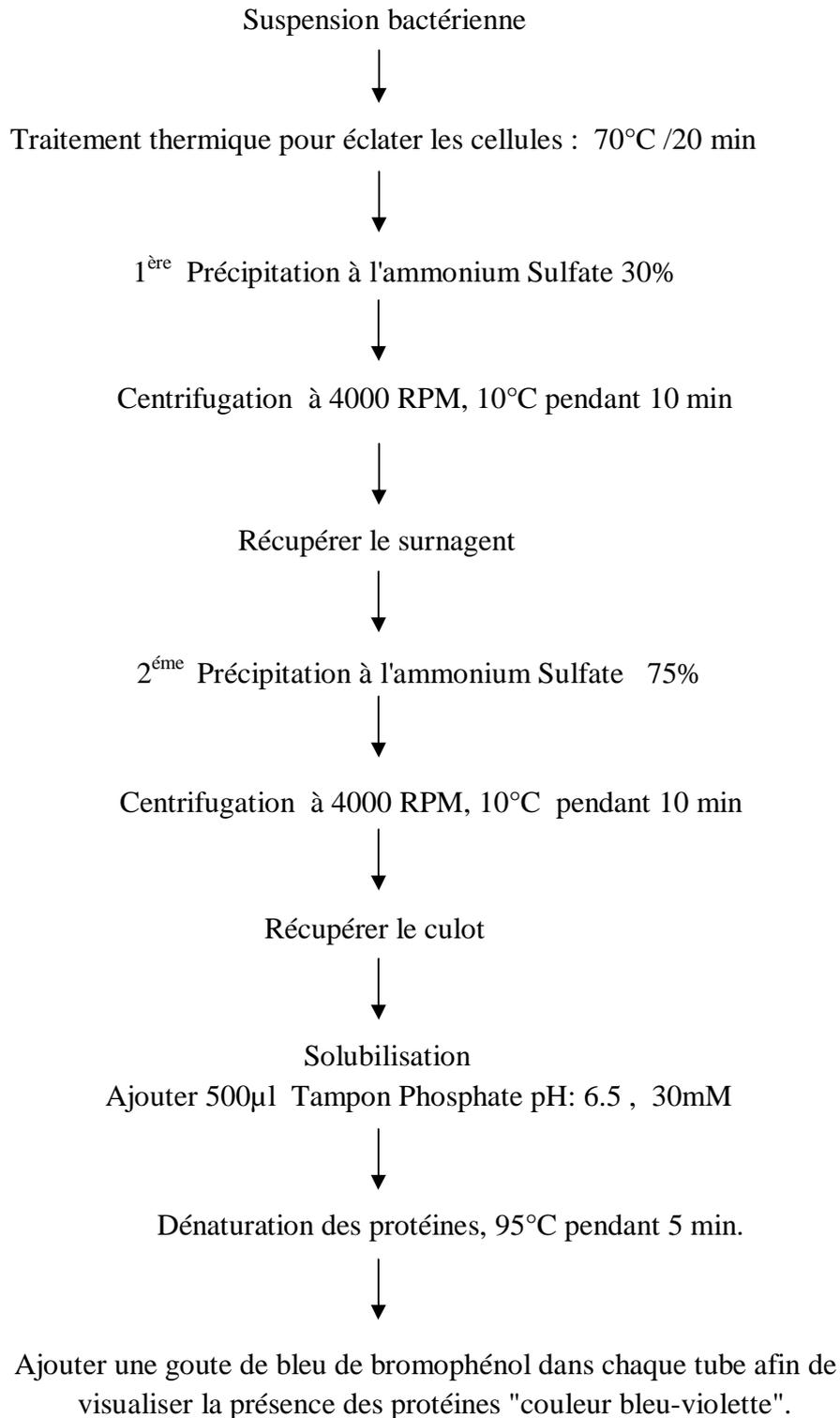
- Recherche des décarboxylases LDC, ODC et ADH
 - Recherche de la Lécithinase et réduction du Tellurites
 - Recherche de la coagulase

3. Analyse protéomique des isolats bactériens

Afin de différencier nos bactéries à base de leurs profil protéomique, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche à l'INAATA, Université Frères Mentouri Constantine. Durant un mois de stage, nous avons été bien reçus au sein du laboratoire du Dr Gagaoua M. qui n'a pas manqué de nous réserver le meilleur accueil et les meilleurs encadrements.

3.1 Extraction et précipitation des protéines bactériennes

Plusieurs étapes ont été réalisées avant de procéder directement à l'électrophorèse. La démarche suivante a été effectuée dans le but d'extraction et précipitation des protéines bactériennes.



3.2 Electrophorèse "SDS-PAGE"

- Préparation de la cuve d'électrophorèse et des gels

Selon le protocole du Dr.Gagaoua (2016) :

- monter les plaques de la cuve avec toutes les précautions d'usage en utilisant les espaceurs adéquats. Vérifier la propreté des plaques.
- Préparer le gel de séparation ou Resolving gel (12 %) dans un petit bêcher de 25mL avec un barreau magnétique selon le tableau ci-dessous :

Tableau 4: Volumes des composants ajoutés pour préparer le gel de séparation

	Volumes pour 2 gels (mL)
Acrylamide / Bisacrylamide	6.0
Tris 1.5 M pH 8.8	3.75
Eau bi-distillée	4.95
SDS 10%	0.1
Agiter avant d'ajouter le TEMED et l'APS en μ L	
TEMED	12
APS 30 mg/mL	100
Volume final (mL)	~15

- Couler 5000 μ l de cette solution pour un gel
- en fin de coulage recouvrir le gel avec 400 μ L d'éthanol à 70 %.
- laisser polymériser environ 25-30 minutes.
- Préparerle gel de concentration ou Stacking gel (3.75 %) dans un petit bêcher de 25mL avec un barreau magnétique selon le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Volumes des composants ajoutés pour préparer le gel de concentration

	Volumes pour 2 gels (mL)
Acrylamide / Bisacrylamide	0.75
Tris 0.5 M pH 6.8	1.5
Eau bi-distillée	3.6
SDS 10%	0.6
Agiter avant d'ajouter le TEMED et l'APS en μ L	
TEMED	10
APS 30 mg/mL	80
Volume final (mL)	~6.55

- couler le stacking.
- insérer immédiatement les peignes appropriés et laisser polymériser au moins 15 à 20 minutes.
- Déposer avec précaution 100µL de chaque culot de nos échantillons dans son puits approprié.
- Déposer la solution de migration dans la chambre extérieur et intérieur de la cuve.
- Ajouter 200µL de solution mercaptoéthanol dans la solution de migration.
- Brancher et allumer le générateur à 80V pendant 30min, puis 145V pendant 3 heures.

- Fixation des gels

Après 3 heures les puits ont accomplie leur migration, les gels sont alors récupérés de la cuve et placer dans un bac contenant une solution de fixation (40% alcool, 10% acide acétique) pendant 10 min.

- Préparation des solutions de coloration

Après fixation, les gels seront colorés au nitrate d'argent. Pour cela, une préparation des solutions a été faite selon le protocole suivant:

Solution de fixation :

Acide acétique 10%	10 mL
Ethanol 40%	40 mL
H ₂ O	50 mL

Solution de sensibilisation pour 50 mL :

Ethanol 30%	15 mL
Sodium thiosulfate 0.2 %	0,1 g + 2mL H ₂ O
Sodium acétate 6,8 %	3,4 g
H ₂ O	33mL

Solution de coloration au nitrate d'argent :

Nitrate d'argent 0,25%	0,125 g + 5 mL H ₂ O
H ₂ O	45 mL

Solution de développement :

Sodium carbonate 2,5 %	1,25 g
H ₂ O	50 mL
Formaldéhyde 0,04 %	20µL

Solution stop :

EDTA 1,46 %	0,73 g
H ₂ O	50 mL

- Coloration au nitrate d'argent

Adapté aux petit gels (50mL), notre gel a été mis successivement dans plusieurs solutions selon le protocole de : Yan *et al.* Electrophoresis 21 (2000) 3666-3672.

Fixation :

- 15 min dans la solution de fixation, jeter la solution.
- 15 min dans une nouvelle solution de fixation.

Sensibilisation :

- 30 min dans la solution de sensibilisation.

Lavage:

- 5 min dans l'eau distillée, jeter l'eau.
- 5 min dans l'eau distillée, jeter l'eau.
- 5 min dans l'eau distillé.

Coloration au nitrate d'argent :

- 20 min dans la solution nitrate d'argent.

Lavage :

- 1 min dans l'eau distillée, jeter l'eau.
- 1 min dans l'eau distillée.

Développement:

- Mettre le gel dans la solution de développement jusqu'à l'apparition des bandes protéiques.

Stop:

- Mettre le gel dans la solution stop pendant 10 min.

Lavage :

- 5 min dans l'eau distillée, jeter l'eau.
- 5 min dans l'eau distillée, jeter l'eau.
- 5 min dans l'eau distillé.

4. Analyse biomoléculaire par séquençage rRNA 16s**- Préparation des échantillons pour PCR et séquençage**

Tous les isolats ont été traités (figure 10). communication personnelle, Dr Kerkoud M. Responsable Scientifique DIAG-GENE, Angers Technopole), avant l'amplification et le séquençage, dans le but de détruire les cellules bactériennes et d'en extraire le génome total :

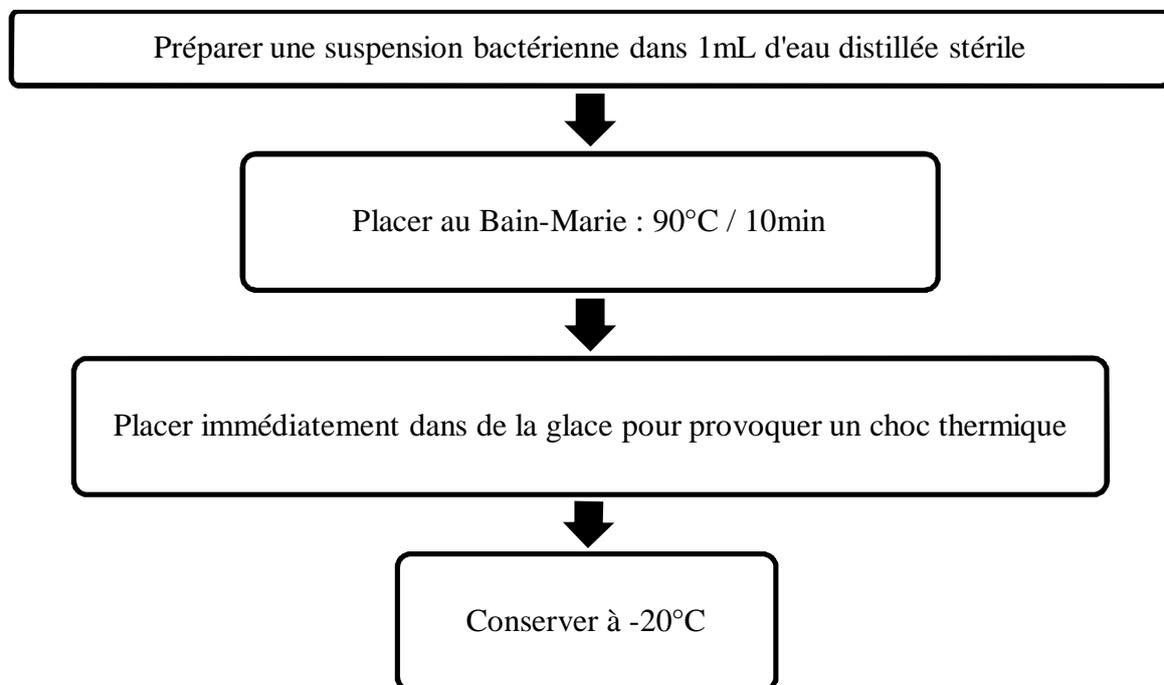


Figure 10 : Etapes préliminaires pour extraction de l'ADN bactérien

Les deux isolats ont été envoyés au laboratoire d'Angers Technopole pour séquençage du gène rRNA 16S. L'amorce universelle employée pour tous les isolats est la 16S-27f:AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (M étant souvent une Cytosine). C'est une amorce spécifique aux séquences moyennement dépassant les 1466 pb. Son amorce inverse est la 1492R : TACGGYTACCTTGTTACGACTT(Y étant souvent une Cytosine).

Les séquences 16 rRNA des deux isolats ont été alignées sur NCBI pour vérifier leur homologie avec les séquences de GenBank. L'approche employée est un BLAST contre la base de données 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea).

5. Analyse bioinformatique des séquences 16S

- Acquisition des séquences 16S

Les séquences récupérées appartiennent à des souches *Staphylococcus* isolées à partir des bovins, des deux régions de Batna et Constantine, et préalablement séquencées. en total il y a 9 séquences 16S, 6 séquences des Staphylocoques de Batna, et 3 séquences de Constantine.

5.1 Analyse thermodynamique de la structure secondaire des ARNr 16S

La structure secondaire de l'ARNr 16S et l'énergie libre ont été prédites par logiciel *RNAFold* dont l'interface est représentée sur la photo 1

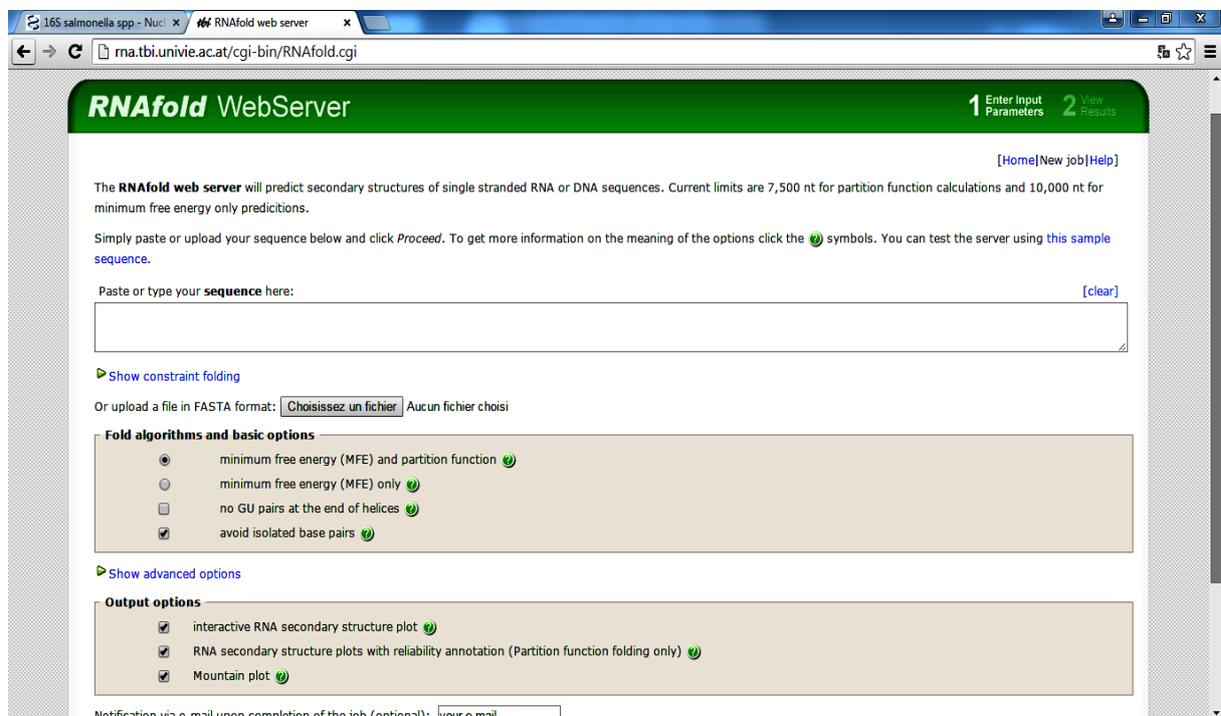


Photo 1 : Interface du site Internet de RNA Fold web server

-Matrice thermodynamique des différences des énergies libres : a été calculée sur le portail Mobyly (Photo 2).

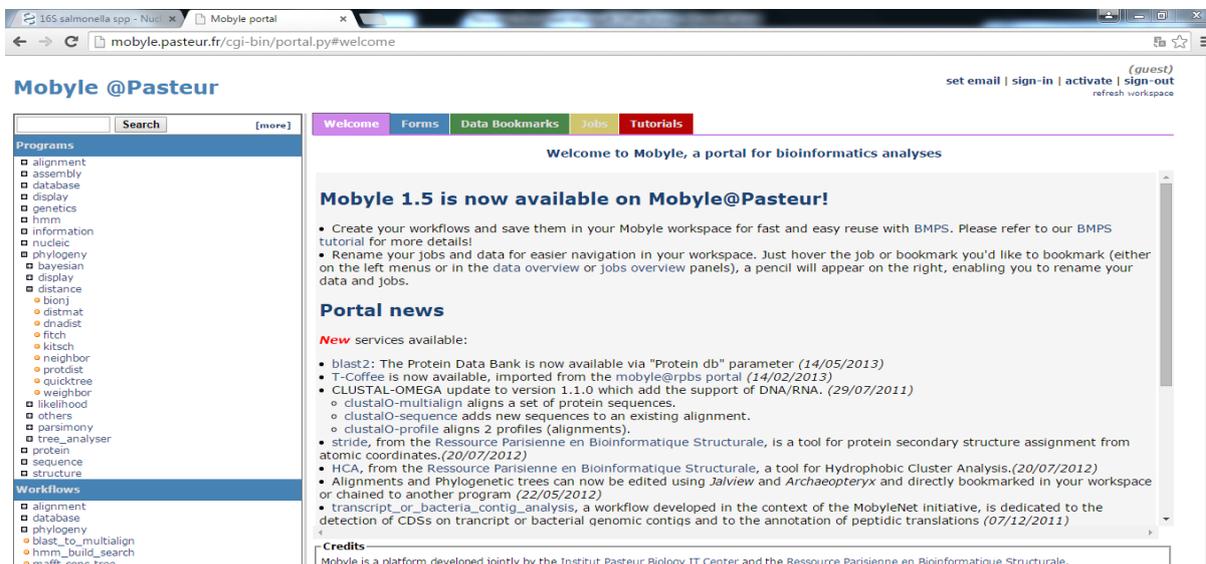


Photo 2 : Interface principale du Portail Mobyly

5.2 Analyse phylogénétique des isolats

Le phylogramme des deux souches a été construit par la méthode des distances Neighbor Joining en utilisant le logiciel Mega 5.2 (Photo 3).

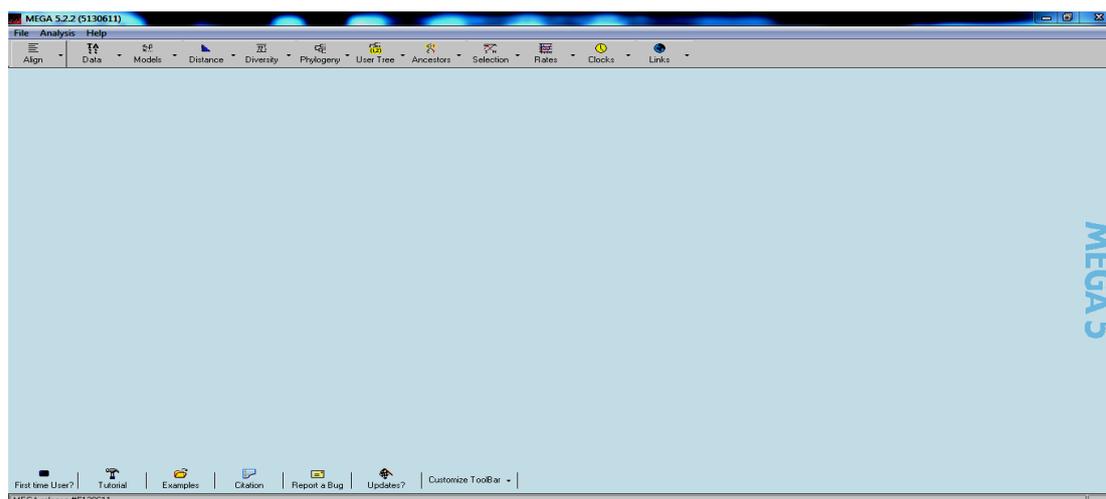


Photo 3 : Interface de Mega 5.2

RESULTATS

1. Analyse microbiologique des souches bactériennes

1.1 Caractérisation bactériennes

Les résultats de l'analyse des caractères morphologique, biochimiques et physiologiques sont portés sur le tableau 6. Ces derniers ont permis une identification présomptive des deux isolats (S1 et S2).

- Aspects macro et microscopique

Les aspects des colonies : colonies assez grandes (1mm de diamètre environ), rondes et régulières caractéristiques des staphylocoques et de couleur crème.

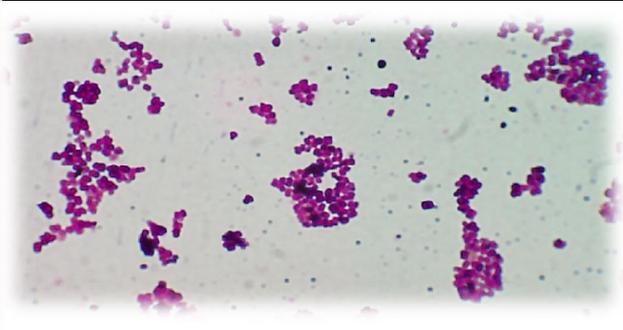
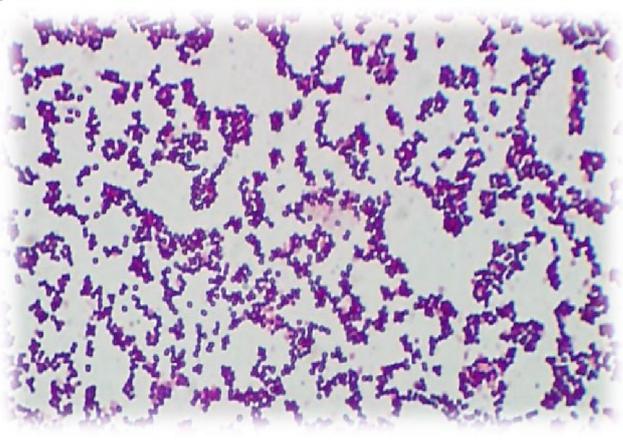
La coloration de Gram est positive pour les deux souches. Cependant, ces derniers possèdent des formes sphériques, ce sont des cocci. Seul le mode de regroupement diffère les deux bactéries : mode de regroupement en grappe de raisin (S1), et mode de regroupement irrégulier pour (S2) (tableau 7).

Tableau 6: Résultats des caractères phénotypiques des deux isolats

	Morphologique	Biochimique					Physiologique		
	Gram	Mannitol	Lécithinase	LDC	ODC	ADH	Catalase	Oxydase	Coagulase
S1	+	+	-	-	+	+	+	-	-
S2	+	-	-	+	+	+	+	+	-

(+) : présence du caractère étudié ; (-) : absence du caractère étudié

Tableau 7 : Aspects macro et microscopiques des isolats.

	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
S1		
S2		

1.1.1 Les caractères biochimiques

Fermentation du mannitol "milieu Chapman"

Seulement la souche S1 a fermentée le mannitol du gélose Chapman, S2 a utilisé le mannitol comme source de carbone et production d'acides dans le milieu, ce qui explique le virage de la couleur de l'indicateur de pH du milieu du rouge au jaune-orangé (photo 4).

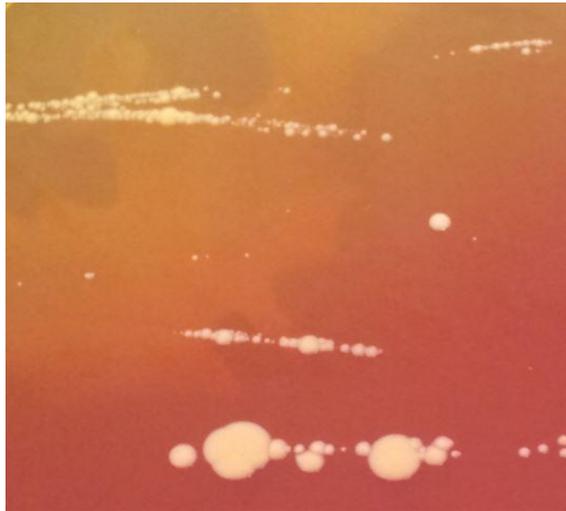


Photo 4 : Aspect du gélose Chapman avec fermentation du mannitol de l'isolat S1

-Production des décarboxylases LDC, ODC et ADH

L'isolat S1 présente un résultat positif des deux enzymes : ODC et ADH, se traduisant par une ré-alcalinisation du milieu (milieu violacé), et un résultat négatif pour l'enzyme LDC, se montrant par acidification du milieu (milieu jaune), le témoin présente aussi un résultat négatif.

L'isolat S2 présente un résultat positif pour chacune des trois enzymes testés, se traduisant par une ré-alcalinisation du milieu (milieu violacé), le témoin présente un résultat négatif.

-Production de la lécithinase

Les deux isolats ont montré une croissance de colonies blanches sur milieu Baird-Parker, sans présence de tellure noire ni d'un halo autour des colonies.

1.1.2 Les caractères physiologiques

-Production de la catalase : Les deux souches sont catalase positive.

-Production de l'oxydase : Seul l'isolat S2 a donné un résultat positif.

-Production de la coagulase : Les deux isolats ont montré un résultat négatif (pas de coagulation du sérum de lapin) après 5h d'incubation au bain Mairie à 37°C.

2. Analyse protéomique des isolats bactériens

-Profil protéique des deux isolats S1 et S2 : La lecture des deux gels (figure 11) montre des bandes concentrées et identiques chez les deux souches. Ces résultats ne nous permettent pas de procéder à une taxinomie binaire.

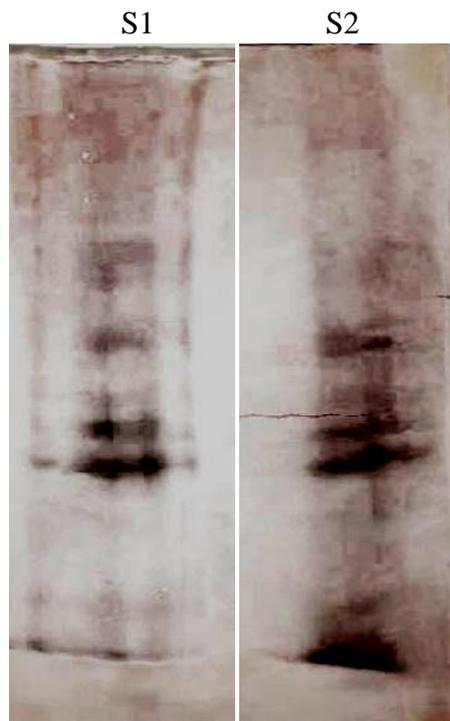


Figure 11 : Profil électrophorétique des deux souches S1 et S2

3. Analyse bioinformatique des séquences 16S des isolats

3.1 Résultat de Blast

Les séquences 16S des deux isolats ont été alignées par le programme Blast afin de déterminer les espèces qui leurs sont homologues (tableau 8).

La souche S1 est homologue à *Staphylococcus haemolyticus*, avec une E-value synonyme d'une bonne identification de notre isolat ($E=0,0$) et une identité des deux séquences de 99%.

La souche S2, cependant, est un *Macroccoccus brunensis*. C'est une espèce apparenté à *Staphylococcus* du fait qu'elles font partie de la même famille des *Staphylococcaceae*.

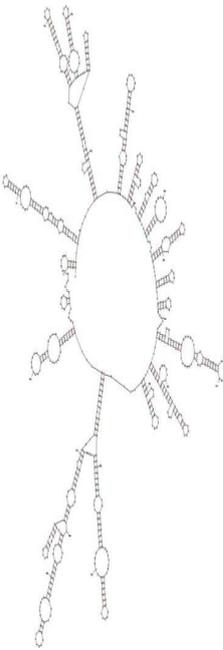
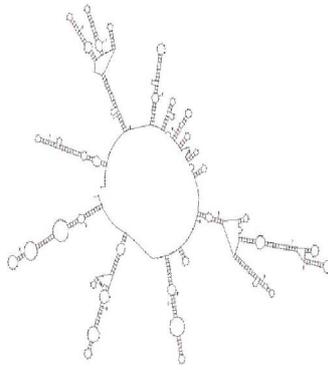
Tableau 8 : Résultats de l'identification des séquences 16S par Blast

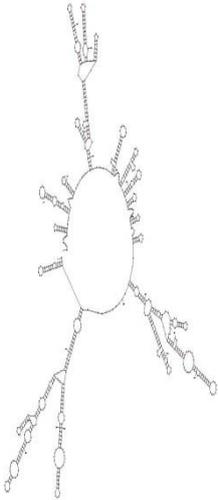
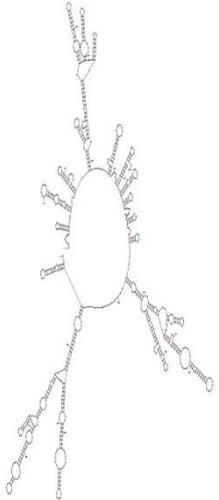
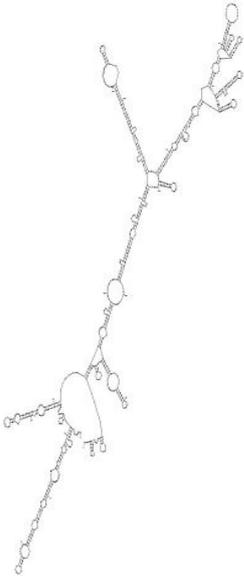
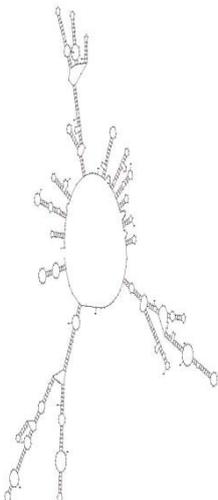
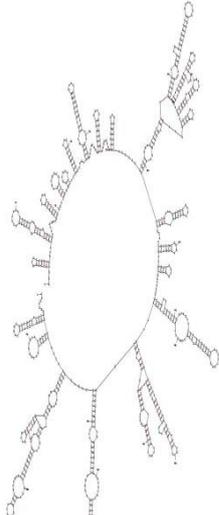
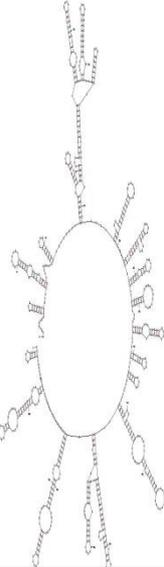
Isolats	BLAST	E Value	Identité	Accession
S1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0.0	1262/1272 (99%)	KU179371,1
S2	<i>Macrocooccus brunensis</i>	0.0	1261/1270 (99%)	HQ696456,1

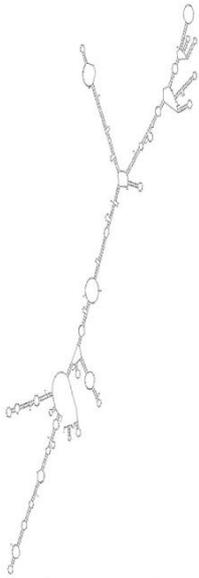
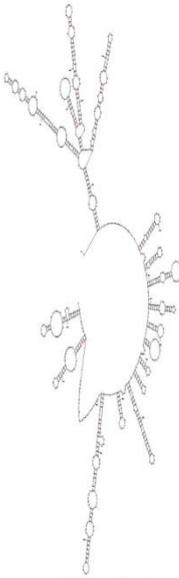
3.2 Prédiction structurale secondaire et énergie libre des ARNr 16S

Après récupération des séquences d'ARNr 16S au format Fasta, la structure secondaire des ARNr 16S ainsi que les énergies libres ΔG° , ΔH° et les énergies du désordre moléculaire ΔS° ont été prédites. Les résultats sont portés sur le tableau 9.

Tableau 9 : Structures secondaires de l'ARNr 16S et l'énergie libre des souches identifiées

<i>Staphylococcus haemolyticus</i> MILA	<i>Macrocooccus brunensis</i> MILA
	
$G^\circ = -239,50 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2241,90 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6456,20 \text{ cal/(K.mol)}$	$G^\circ = -247,10 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2308,50 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6646,40 \text{ cal/(K.mol)}$

<p><i>Staphylococcus cohnii</i> BATNA</p>	<p><i>Staphylococcus hominis</i> BATNA</p>	<p><i>Staphylococcus haemolyticus</i> CONSTANTINE</p>
		
<p>$G^\circ = -246,30 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2322,90 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6695,40 \text{ cal/(K.mol)}$</p>	<p>$G^\circ = -244,10 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2325,30 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6710,30 \text{ cal/(K.mol)}$</p>	<p>$G^\circ = -198,70 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2152,40 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6299,20 \text{ cal/(K.mol)}$</p>
<p><i>Staphylococcus hominis</i> BATNA</p>	<p><i>Staphylococcus hominis</i> BATNA</p>	<p><i>Staphylococcus saprophyticus</i> CONSTANTINE</p>
		
<p>$G^\circ = -244,60 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2331,80 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6729,60 \text{ cal/(K.mol)}$</p>	<p>$G^\circ = -244,0 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2276,60 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6553,60 \text{ cal/(K.mol)}$</p>	<p>$G^\circ = -223,0 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2028,90 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -5822,60 \text{ cal/(K.mol)}$</p>

<i>Staphylococcus haemolyticus</i> BATNA	<i>Staphylococcus equorum</i> CONSTANTINE	<i>Staphylococcus hominis</i> BATNA
		
$G^\circ = -199,10 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2194,70 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6434,30 \text{ cal/(K.mol)}$	$G^\circ = -194,30 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2024,30 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -5900,30 \text{ cal/(K.mol)}$	$G^\circ = -199,0 \text{ kcal/mol}$ $H^\circ = -2196,80 \text{ kcal/mol}$ $S^\circ = -6441,40 \text{ cal/(K.mol)}$

3.3 Analyse phylogénétique des isolats

L'analyse du phylogramme (figure 12) indique un partage phylogénétique en deux groupes distincts :

Groupe 1 constitué des individus 1, 11, 6 et 10 et incluant les deux souches isolées de Grarem.

Groupe 2 contenant les individus 8, 9, 3 et 7.

La souche N°8 *Staphylococcus equorum* de Constantine peut être considérée comme un out group vue sa position sur l'arbre phylogénétique. Cette supposition est corroborée par la valeur du bootstrap égale à 100.

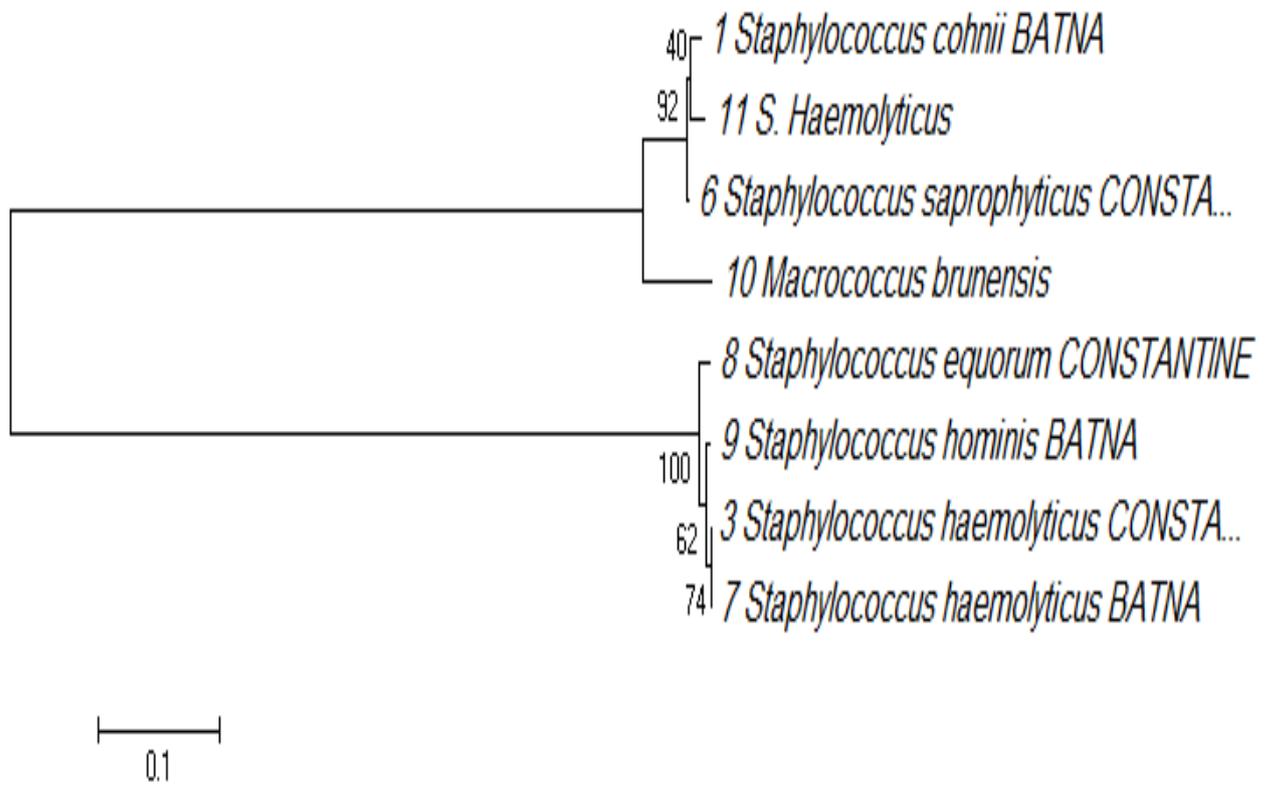


Figure 12 : Phylogramme construit selon le modèle de Kimura à deux paramètres

DISSCUSSION GENERALE

Les deux souches isolées durant notre travail, ont été caractérisées sur la base de leurs caractères phénotypiques. Cette approche à elle seule n'est pas suffisante pour prétendre à une identification définitive et formelle (Holt *et al.*, 1994 ; Prescott *et al.*, 2003 ; Joffin *et al.*, 2006). Certains caractères, tels que la fermentation du mannitol qui est positive chez l'isolat S1, et négative chez S2.

La production de la catalase chez nos deux isolats indique que les isolats sont pathogènes d'après Schleifer *et al.*(1982) et Brun et Bes, (2000). La production d'oxydase est négative chez l'isolat S1 comme le confirment les études de Schleifer *et al.*(1982) et Brun et Bes, (2000) mais elle est positive chez l'isolat S2 ce qui un peu rare chez les staphylocoques. Ce résultat est identique chez aux travaux de Kloos et Bannerman (1994) et Freney *et al.* (1999).

Le caractère négatif de la coagulase de nos souches ne rend pas leur pathogénicité négligeable, ils sont reconnus comme bactéries pathogènes opportunistes comme le confirment Denis *et al.* (2007).

Les profils électrophorétiques des deux souches renseignent sur la possibilité d'utiliser cette technique en microbiologie afin de confirmer la place systématique des germes isolés. Cependant, il faut améliorer la qualité des gels pour faire meilleure distinction entre les individus bactériens.

L'identification par le gène 16S rRNA a révélé la présence de deux espèces bovines différentes (*S. haemolyticus* et *M. brunensis*). Ce résultat est corroboré par Gourreau (2008) car il note une large distribution de ces germes au sein de la communauté bovines.

La prédiction des structures 2D des rRNA 16S a révélé des structures avec des topologies totalement éloignées avec des énergies libres différentes ($G^\circ = -239,50$ Kcal/mol et $G^\circ = -247,10$ Kcal/mol. Respectivement pour S1 et S2).

Ce résultat exprime la possibilité d'inclure cette approche 2D comme outil d'aide à la détermination des isolats bactériens comme le préconise Gütler (1996).

CONCLUSION

Les deux objectifs définis en début de travail étaient d'estimer l'incidence staphylococcique chez les vaches prélevées à Grarem (Wilaya Mila) et d'utiliser les séquences rRNA 16S afin d'identifier les isolats et d'en prédire les structures 2D. Notons que neuf isolats staphylococciques (Six de Batna et trois de Constantine) déjà prélevés dans le cadre de Doctorat nous ont été fournis afin d'en estimer la structure secondaire et de les comparer avec les isolats de Grarem.

Au vu des résultats phénotypiques et biomoléculaires obtenus, il ressort que les deux souches isolées des vaches de Grarem sont *Staphylococcus haemolyticus* et *Macrococcus brunensis*. Les souches entrant dans l'enquête rétrospective du Doctorat sont : Quatre souches *S. hominis*, une *S. cohnii* et une *S. haemolyticus*.

L'analyse des protéines totales a donné un début de résultat qu'il faut développer plus avec le Dr Gagaoua M. pour affiner la séparation des protéines dans le but d'étudier les isolats selon l'approche taxinomique binaire pour faire office d'une valeur ajoutée à la détermination de la place systématique des différents isolats.

La prédiction des structures 2D des isolats a montré une topologie structurale avec des motifs structuraux similaires pour les mêmes espèces et différentes pour les espèces éloignées.

Enfin, nous considérons que l'incidence des isolats ne peut être mesurée ni comparée aux références du fait de la faible taille car, il est difficile de récolter des pathogènes en toutes dimensions spatio-temporelles. Il est important d'en utiliser des effectifs de vaches et de fermes plus importants pour mieux apprécier l'incidence staphylococcique bovine.

Une analyse bioinformatique des structures 2D plus approfondie pourrait apporter d'autres éléments d'identification bactérienne, dont l'alignement des images par des programmes de traitement informatique et confirmer les résultats par la prédiction 3D qui fait l'objet de travaux très récents à l'échelle des laboratoires de recherche microbiologiques.

Références Bibliographiques

1. Anzai Y., Kim H., Park J. Y., *et al.* (2000). Phylogenetic affiliation of the Pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1563-1589.
2. Argaman L., Hershberg R., Vogel J., Bejerano G., Wagner E.G., Margalit H., Altuvia S. (2001). Novel small RNA encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol.* **11** (12) : 941-50.
3. Baird-Parker A.C. (1971). The drouping of *Staphylococci* and *Micrococci*. *J Clin Pathol.* **24** : 769-770.
4. Bascomb S., Manafi M. (1998). Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* **11** : 318-340.
5. Boudar M. (2016). *Prédiction de structure tridimensionnelle de molécules d'ARN par minimisation de regret. Informatique et théorie des jeux.* Thèse Doctorat. Université Paris-Saclay. 151 p.
6. Boutet P., Detilleux J., Motkin M., Deliege M., Piraux E., Depinois A., *et al.* (2005). Comparaison du taux cellulaire et de la sensibilité antimicrobienne des germes de mammites subclinique bovine entre les filières conventionnelle et biologique. *Ann. Méd. Vét.* **149** : 173 ó 182.
7. Chakravorty S., Helb D., Burday M., *et al.* (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **69** : 330-339.
8. Clarridge J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev.* **17** : 840-862.
9. Denis F., Martin C., Bingen E., Quentin R., Ploy M.C. (2007). *Bactériologie médicale Techniques usuelles.* Elsevier Masson, Issy les Moulineaux. 252 p.

10. Dock-Bergeon A. C., Chevrier B. A., Podjarny A. J., *et al.* (1989). Crystallographic structure of an RNA helix. *J Mol Biol.* 209 (3) : 459-474.
11. Doty P., Boedtker H., Fresco J. R. , *et al.*(1959). Secondary Structure in Ribonucleic Acids.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. **45**, pp. 482-499.
12. Dumas C. (2012). Génome: pour en finir avec l'ADN. *Science Avenir*.
13. Eden P.A., Schmidt T.M., Blakemore R.P., Pace N.R. (1991). Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA-Specific DNA. *Int J Syst Bacteriol.* **41** (2): 324-325.
14. Euzéby J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature : a folder available on the internet. *Int J Syst Bacteriol.* **47** : 590-592.
15. Garcia-Martínez, J., Acinas, S. G., Antón, A. I. et Rodríguez-Valera, F. (1999). Use of the 16S 23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods***36**: 55-64.
16. Garcia-Martinez J., Martinez-Murcia A., Anton A.I., Rodriguez-valera F. (1996). Comparison of the small 16S to 23S Intergenic spacer region (ISR) of rRNA Operons of some *E.coli* Strains, of the ECOR collection and *E.coli* K-12. *J. Bacteriol.***178** : 6374-6377.
17. Garrity G. M., and Holt J. G. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Springer-Verlag. New York. pp 119-169.
18. Garrity G.M., Lilburn T.G., Cole J.R., *et al.* (2007). Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. Part 9 the Bacteria :*Phylum "Firmicutes"* : Class "Bacilli".
19. Georg J., Hess W.R. (2011). Cis-antisense RNA another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **75** (2) : 286-300.
20. Georg J., Voss B., Scholz I., *et al.* (2009). Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol.* **5**: 305.

21. Goldman S.R., Sharp J.S., Vvedenskaya I.O., *et al.* (2011). NanoRNAs prime transcription initiation *in vivo*. *Mol Cell*. **42** (6) : 817-25.
22. Gottesman S., Storz G. (2011). Bacterial small RNA regulators : versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3 (12).
23. Gourreau J.M., Bendali F. (2008). *Maladies des Bovins*. 4^{ème} édition. Edition France Agricole. 383 p.
24. Güell M., Van Noort V., Yus E., *et al.* (2009). Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science*. **326** (5957) : 1268-71.
25. Güntler V., Stanisich V.A. (1996). New approaches to typing and identification of Bacteria using 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142 : 3-16.
26. Gürtler, V. et Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.*, **142**: 3-16.
27. Holbrook S. R., Cheong C., Tinoco I. J.r., *et al.* (1991). Crystal structure of an RNA double helix incorporating a track of non-Watson-Crick base pairs. *Nature*, **353** : 579-581.
28. Janda J. M., Abbott S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory : pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol*. **45** : 2761-2764.
29. Jiang, H., Dong H., Zhang G., *et al.* (2006). Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. *Appl. Environ. Microbiol*. **72** (6): 3832-3845.
30. Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Williams & Wilkins. pp.1013-1035.
31. Kolbert, C. P. et Persing, D. H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as tool for identification of bacterial pathogens. *Microbiol*. **2**: 299-305.

32. Lasa I., Toledo-Arana A., Dobin A., *et al.* (2011). Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108** (50) : 20172-7.
33. Lemieux S., Major F. (2002). RNA canonical and non-canonical base pairing types : a recognition method and complete repertoire. *Nucleic Acids Research*, **30** (19) : 4250-4263.
34. Leontis N. B., Westhof E. (2001). Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA*. **7** : 499-512.
35. Lioliou E., Sharma C.M., Caldelari I., *et al.* (2012). Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression. *PloS Genet.* **8** (6): e1002782.
36. LPSN. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. [www.bacterio.net / Staphylococcus.html](http://www.bacterio.net/Staphylococcus.html). Consulté en Juin 2016.
37. Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fox, G.E., *et al.* (1981). A phylogenetic analysis of *staphylococci*, *Peptococcus saccharolyticus* and *Micrococcus mucilaginosus*. *J Gen Microbiol.* **125** : 357-366.
38. Madigan M.T., Martinko J.M. (2007). *Brock Biologie des microorganismes*. 11^{ème} édition. Nouveaux Horizons. pp: 311- 875.
39. Marchandin H., Teyssier C., de Buochberg M.S., *et al.* (2003). Intrachromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* **149**: 1493-1501.
40. Mears J.A., Cannone J.J., Stagg S.M., *et al.* (2002). Modeling a minimal riosome based on comparative sequence analysis. *J.Mol.Biol.* **321**: 215-234.
41. Nauciel C. (2000). *Bactériologie médicale*. 2^{ème} édition. Masson-Paris. pp 83-85.
42. Noller F. H. (1984). The structure of ribosomal RNA. *Ann Rev Biochem*, **53** : 119-162.

43. Olsen G. J., Woese C. R. (1993). Ribosomal RNA : a key to phylogeny. *FASEB J* 7, 113-123.
44. Palleroni N. J. (2005). Genus I. *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Part B : The Proteobacteria. Springer. New York. pp 323-379.
45. Peix A., Ramirez-Bahena M.H., Velazquez E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*. **9** : 1132-1147.
46. Petti C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious Diseases*. **44** :1108-1114.
47. Pulverer G., Peters G., Schumacher-Perdreau F. (1987). Coagulase-negative staphylococci. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. **264** : 1-28.
48. Rietveld K., Van Poelgeest R., Pleij C. W., *et al.* (1982). *The tRNA-like structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA*. *Nucleic Acids Res.* Vol 10. n° 6. pp 1926-1946.
49. Rivas E., Klein R.J., Jones T.A., Eddy S.R. (2001). Computational identification of noncoding RNAs in *E.coli* by comparative genomics. *Curr Biol*. 11 (17) : 1369-73.
50. Saenger W. (1984). Principles of nucleic acid structure. Spring-Verlag.
51. Scharma C.M., Hoffmann S., Darfeuille F., *et al.* (2010). The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. **464** (7286) : 250-5.
52. Schneider., D.A.R. , Gourse W., R.L. (2003). Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr.Opin.Microbiol*. **6** : 151-156.
53. Schmeing T.M., Ramakrishnan V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature***461** : 1234-1242.

54. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classic nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**:479-491.
55. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., *et al.* (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J SystEvolMicrobiol* **52** : 1043-1047.
56. Staple D. W., Butcher S.E. (2005). *Pseudoknots : RNA Structures with Diverse Functions*. Vol 3. n° 6. e213. *PloSBiol*
57. Toledo-Arana A., Dussurget O., Nikitas G., *et al.* (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*. **459** (7249) : 950-6.
58. Wassarman K.M., Repoila F., Rosenow C., Storz G., Gottesman S. (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*.
59. Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., *et al.* (2012). *Biologie moléculaire du gène*. 6^{ème} édition. Pearson education France. pp 491-508.
60. Watson J., Hopkins N., Roberts J., Weiner A. (1987). Molecular Publishing Company Inc. Menlo Park. CA.
61. Weidner S., Arnold W., Pühler A. (1996). Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophilastipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Env Microbiol* **62** (3): 766-771.
62. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., *et al.* (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173** : 697-703.
63. Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51** : 222-270.
64. Woese, C. R., G. E. Fox. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74** (11): 5088-5090.

Annexe 5 : Séquence 16S de *Staphylococcus cohnii* en format EMBL

>3 Staphylococcus cohnii BATNA

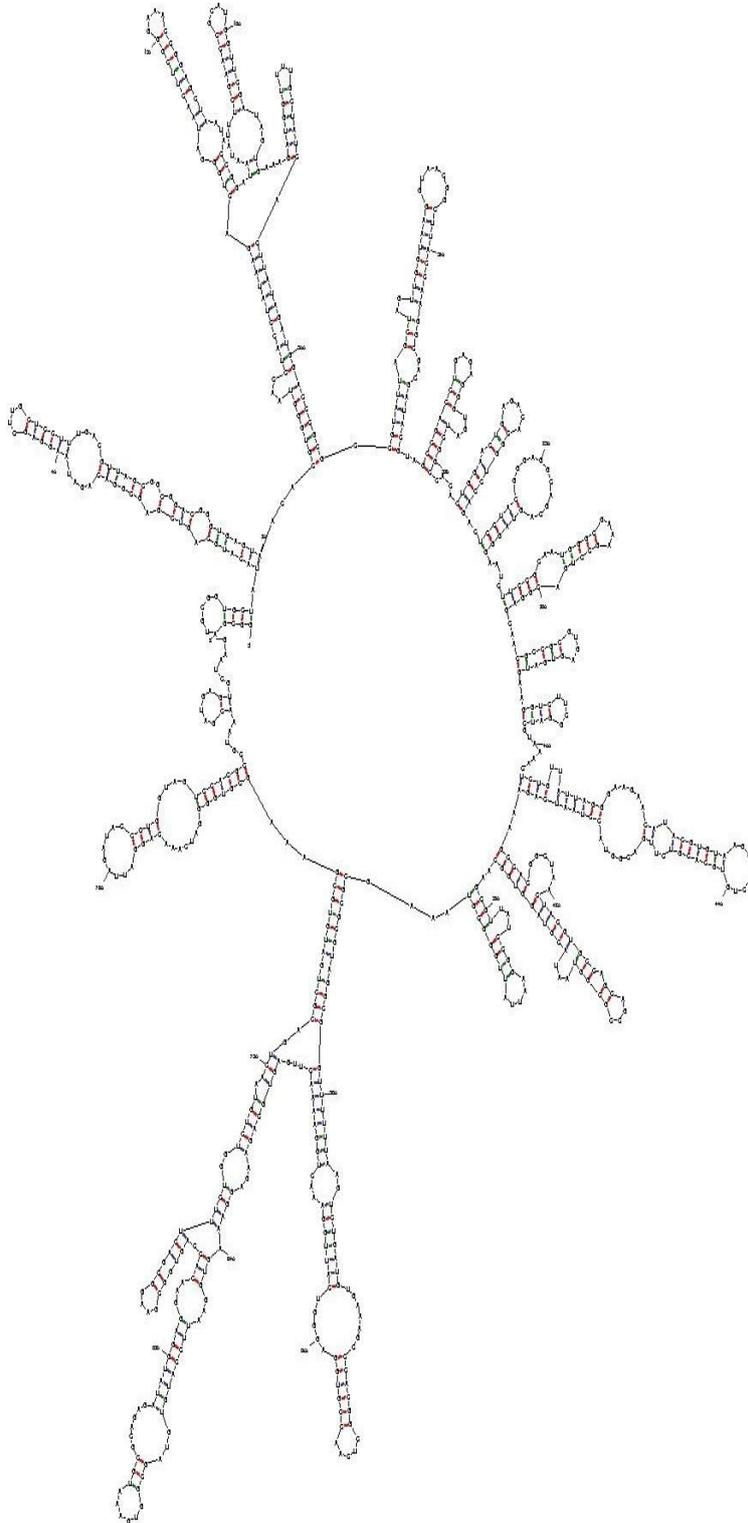
SQ Sequence 1517 BP; 410 A; 334 C; 442 G; 331 T; 0 other;
TAGAGTTTGA TCCTGGCTCA GGATGAACGC TGGCGGCGTG CCTAATACAT GCAAGTCGAG 60
CGAACAGATA AGGAGCTTGC TCCTTTGACG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG 120
TAACCTACCT ATAAGACTGG AATAACTCCG GGAAACCGGG GCTAATGCCG GATAACATTT 180
AGAACCGCAT GGTTCTAAAG TGAAAAGATGG TTTTGCTATC ACTTATAGAT GGACCCGCGC 240
CGTATTAGCT AGTTGGTAAG GTAACGGCTT ACCAAGGCAA CGATACGTAG CCGACCTGAG 300
AGGGTGATCG GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA 360
GGGAATCTTC CGCAATGGGC GAAAGCCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGTC 420
TTCGGATCGT AAAACTCTGT TATTAGGGAA GAACAAATGT GTAAGTAACT ATGCACGTCT 480
TGACGGTACC TAATCAGAAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA 540
GGTGGCAAGC GTTATCCGGA ATTATTGGGC GTAAAGCGCG CGTAGGCGGT TTCTTAAGTC 600
TGATGTGAAA GCCCACGGCT CAACCGTGGA GGTTCATTGG AACTGGGAA ACTTGAGTGC 660
AGAAGAGGAA AGTGGAAATTC CATGTGTAGC GTGAAATGC GCAGAGATAT GGAGGAACAC 720
CAGTGGCGAA GGCGACTTTC TGGTCTGTAA CTGACGCTGA TGTGCGAAAG CGTGGGGATC 780
AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGGGG 840
GTTTCCGCCC CTTAGTGCTG CAGCTAACGC ATTAAGCACT CCGCCTGGGG AGTACGACCG 900
CAAGGTTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG ACCCGCACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA 960
ATTCGAAGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAA TCTTGACATC CTTTGACAAC TCTAGAGATA 1020
GAGCCTTCCC CTTCCGGGGA CAAAGTGACA GGTGGTGCAT GGTGTGTCGC AGCTCGTGTC 1080
GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCCTT AACTTAGTT GCCAGCATTT 1140
AGTTGGGCAC TCTAAGTTGA CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA 1200
ATCATCATGC CCCTTATGAT TTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGACAAT ACAAAGGGCA 1260
GCTAAACCGC GAGGTCATGC AAATCCCATA AAGTTGTTCT CAGTTCGGAT TGTAGTCTGC 1320
AACTCGACTA CATGAAGCTG GAATCGCTAG TAATCGTAGA TCAGCATGCT ACGGTGAATA 1380
CGTTCCCGGG TCTTGACAC ACCGCCGTC ACACCACGAG AGTTTGTAAC ACCCGAAGCC 1440
GGTGGAGTAA CCATTTATGG AGCTAGCCGT CGAAGGTGGG ACAAATGATT GGGGTGAAGT 1500
CGTAACAAGG TAGCCGT

//

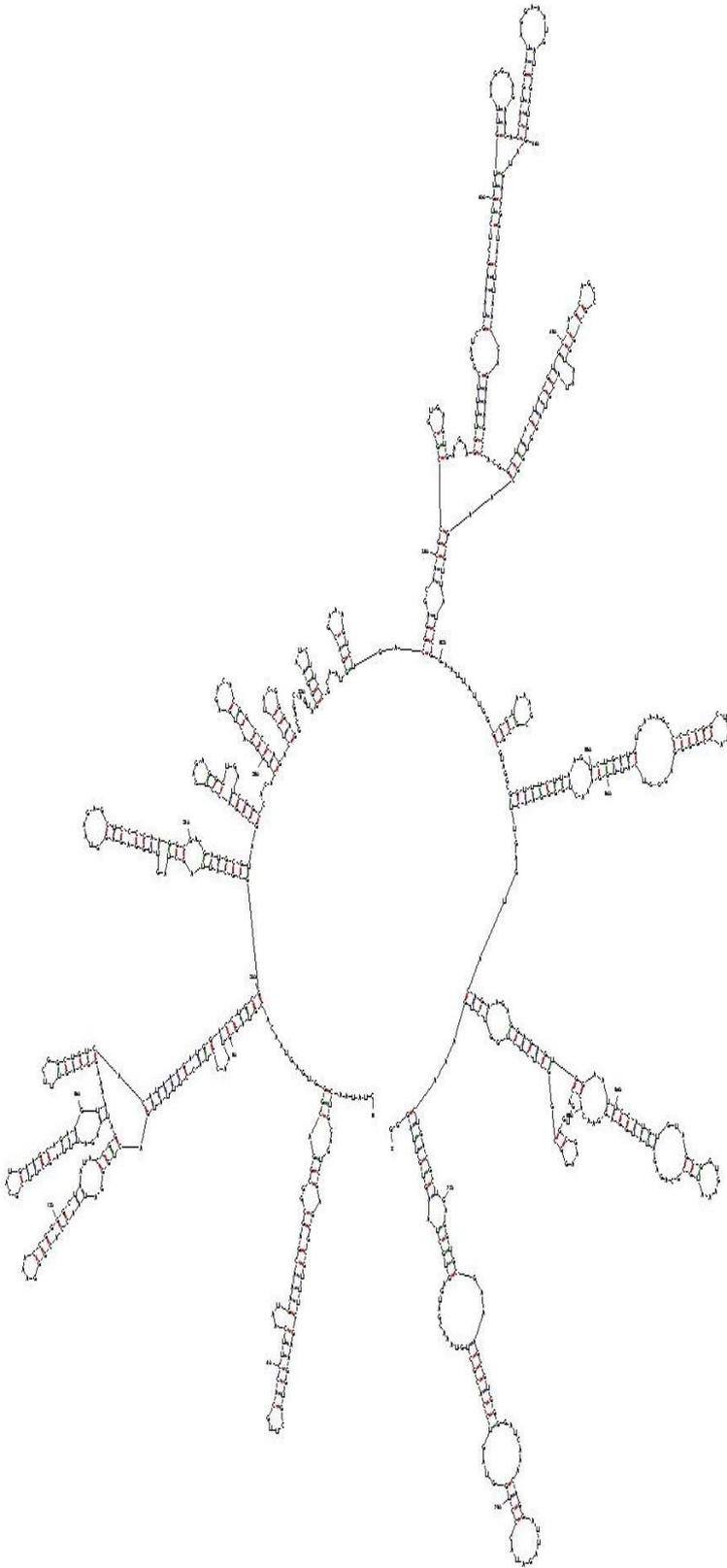
Annexe 6 : Séquence 16S de *Staphylococcus cohnii* en format Vienna

.....((((((...))))))...(((((((.(((((......))))))..))))..))....((((((.....
)))))).....(((((((.(((.(.....).)))(((((((.(((((.(((((.(((((.(((((.(((((.(((((.((((
).))...))))).((...((((((((((.....)))))))))..))..(((((((...))))).)))))))).))))))..))
))....(((..((((((((((.....)))))))))....(((.(((((((.....))))..))))).).((((
(.((((.....)))))))).((((.....)))).....((((.....)))).....((((.....))))..(((((((.((((
(.(((((((.(((.(.....).)))(((((((.(((((.(((((.(((((.(((((.(((((.(((((.(((((.((((
)).....)))))))))..))))))(((((((.((((((((((.....)))))))))..))))))..))))))..))))..
.....(((((((.(((((((.((((((((((.....)))))))))..))))))....))))))....))))))....))))))
).))...))))))....(((((((((((.(((.(.....).)))))))))....))))))....))))))....))))))
.(((((((.....))))))..))))))..))))))..))))))..))))))..))))))..))))))..))))))..))))))..

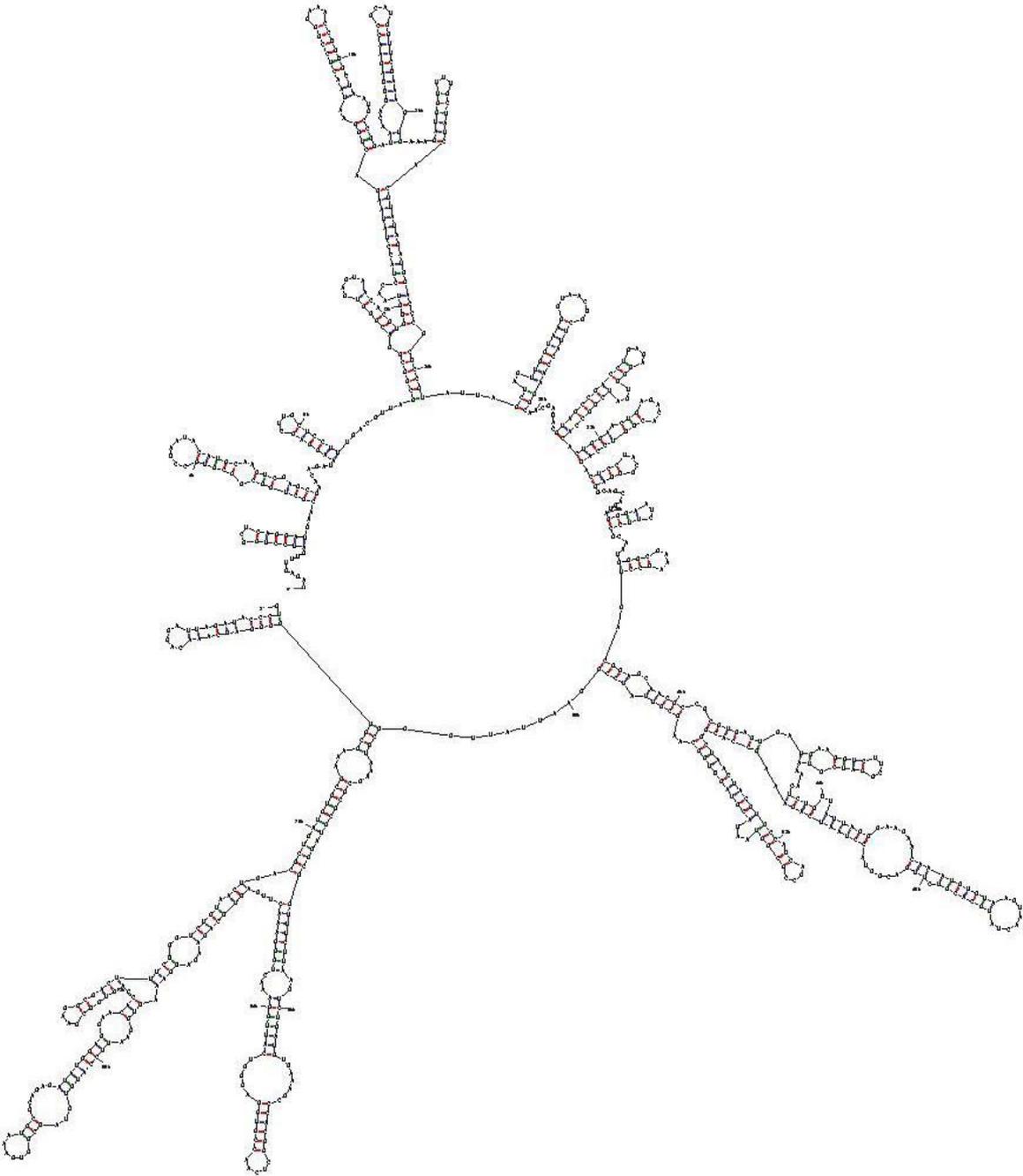
Annexe 23 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus haemolyticus* MILA



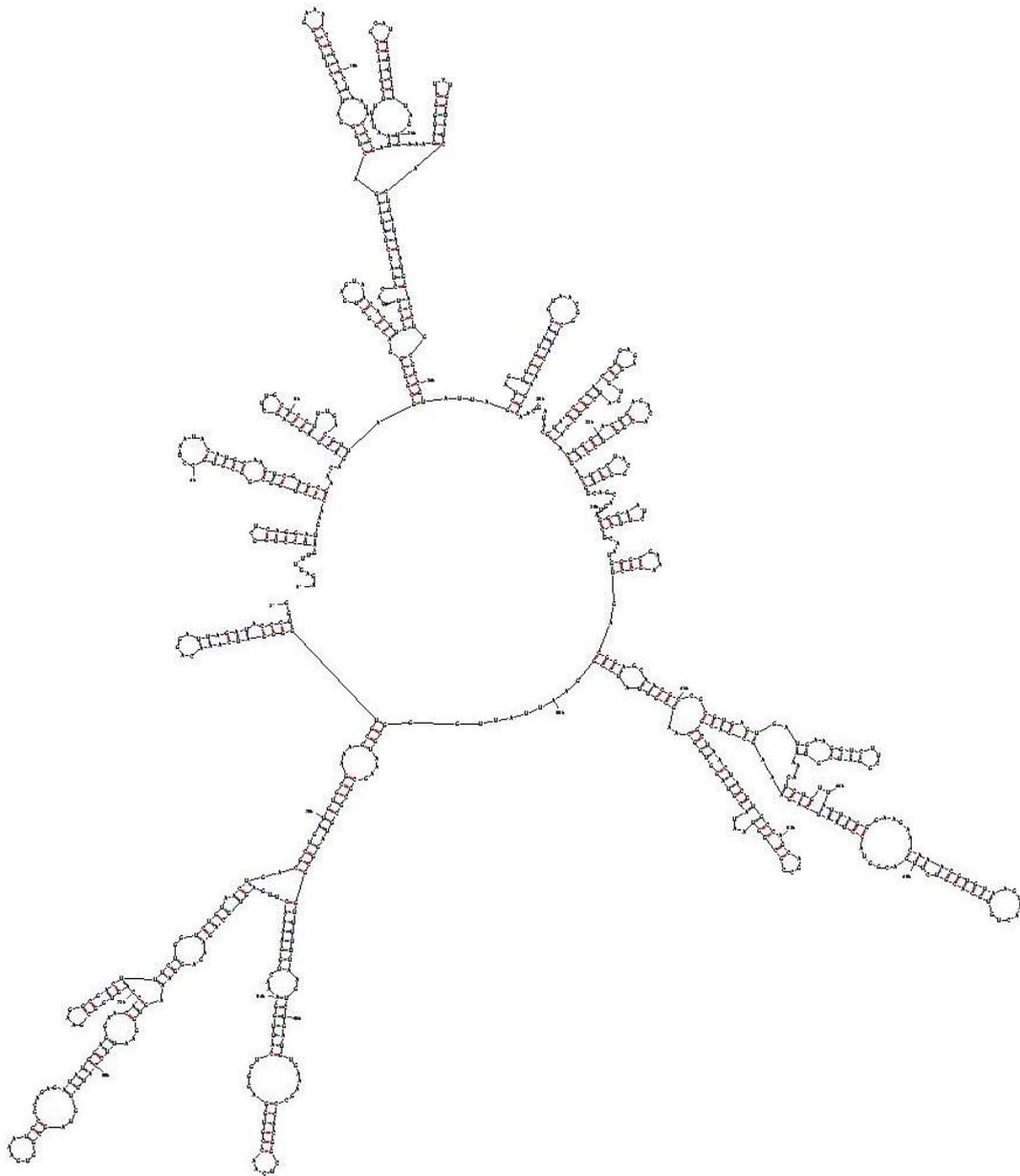
Annexe 24 : Structure secondaire 2D 16S de *Macrocooccus brunensis* MILA



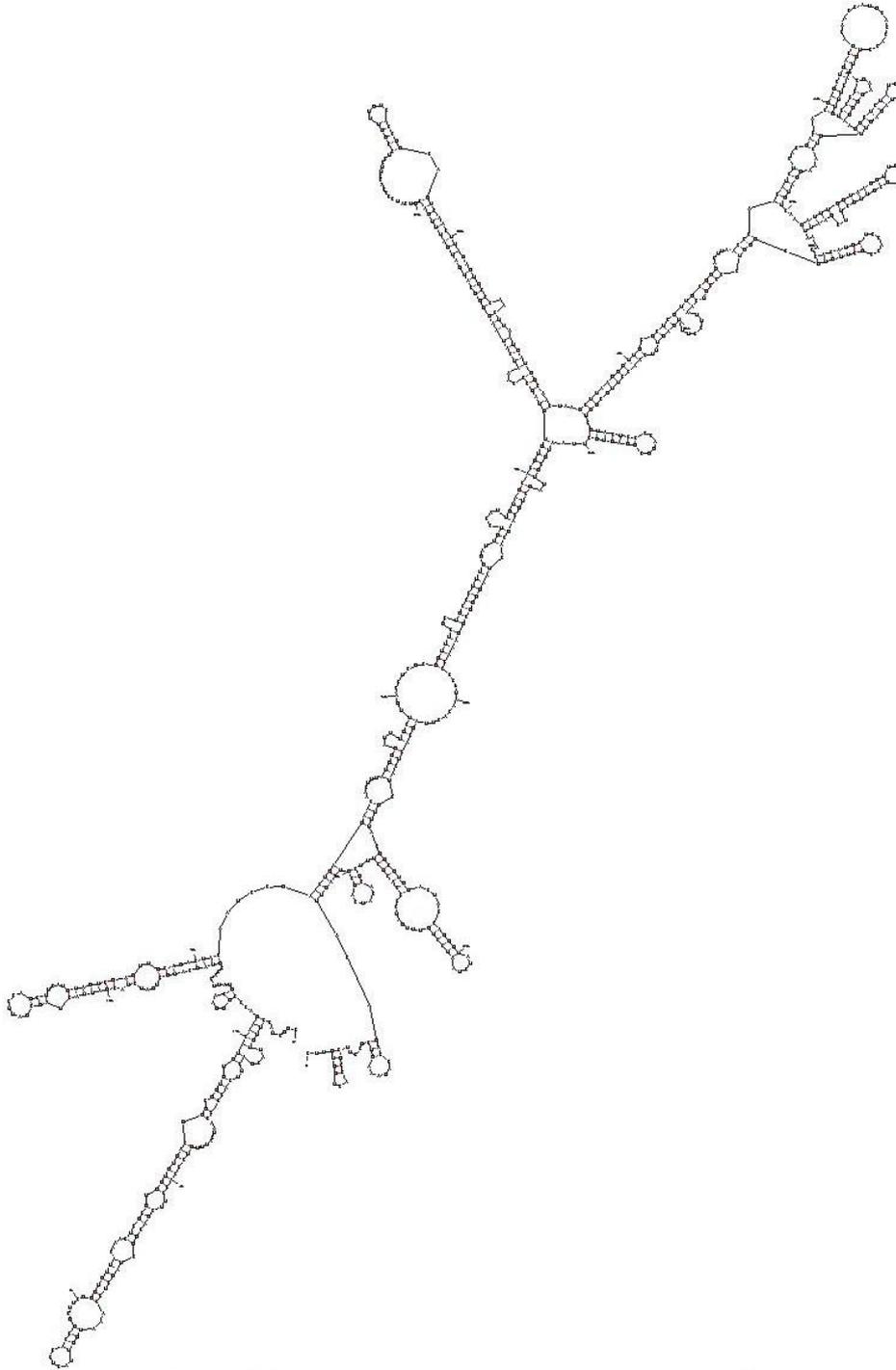
Annexe 25 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus cohnii* BATNA



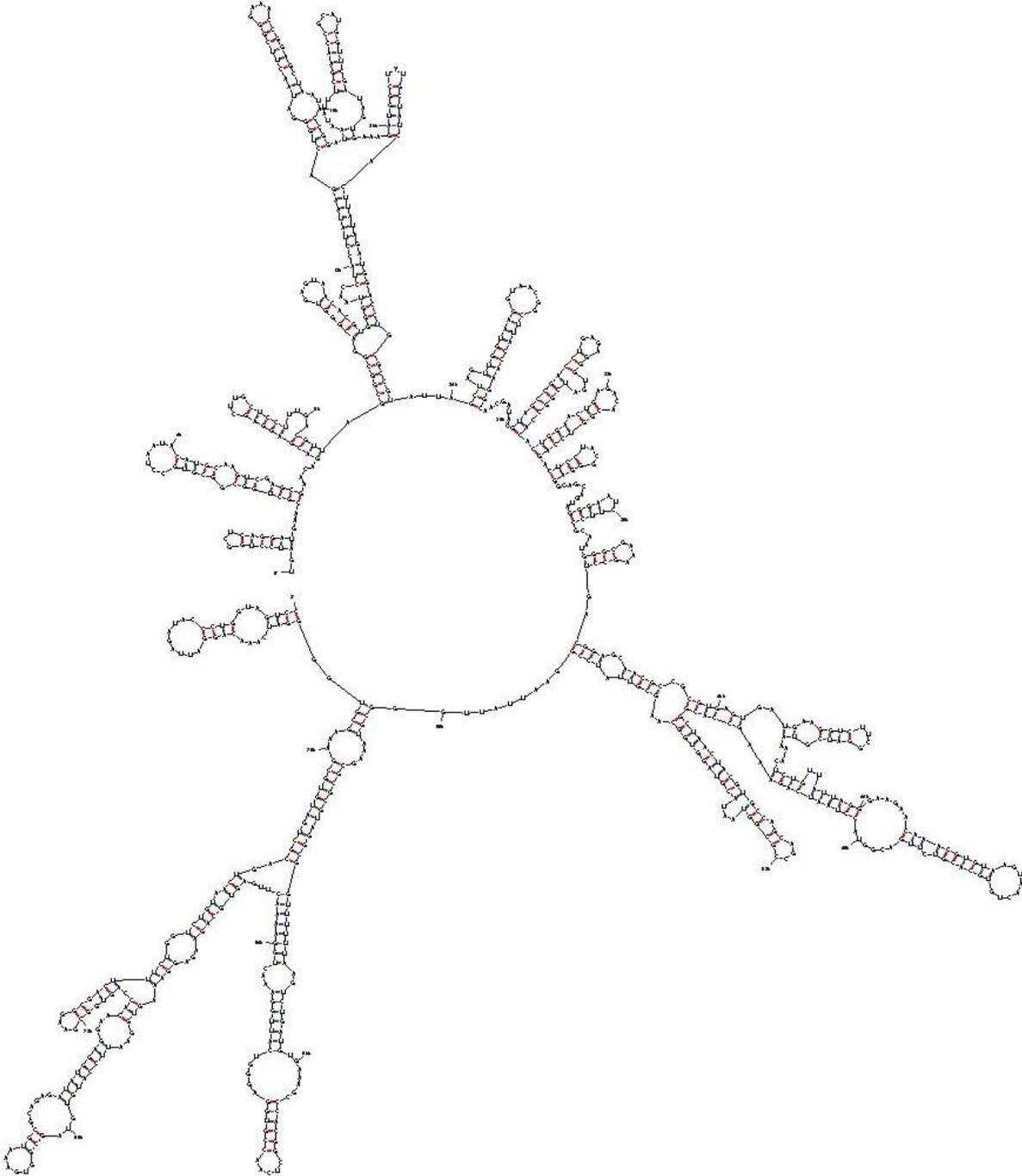
Annexe 26 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis* BATNA



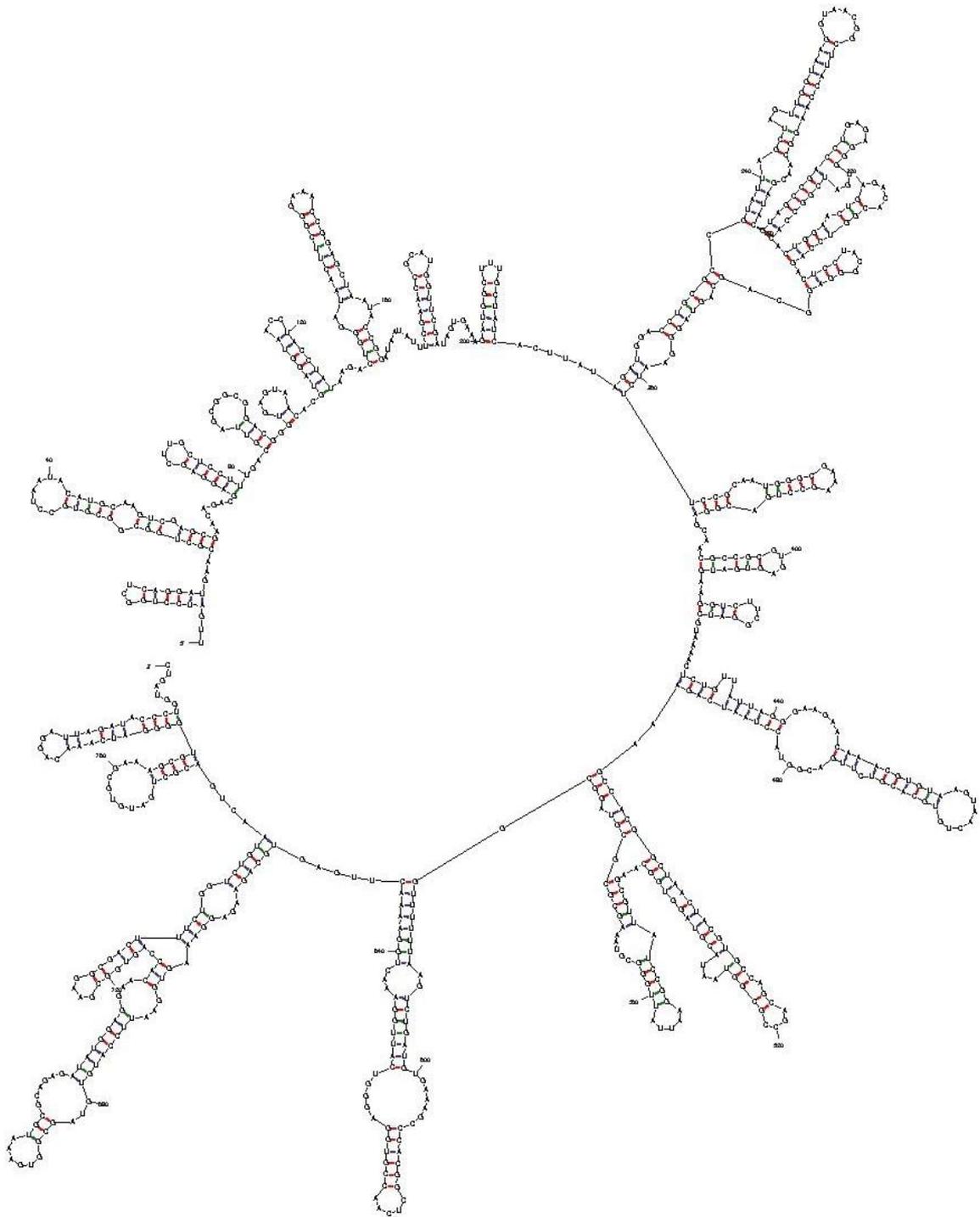
Annexe 27 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus haemolyticus* CONSTANTINE



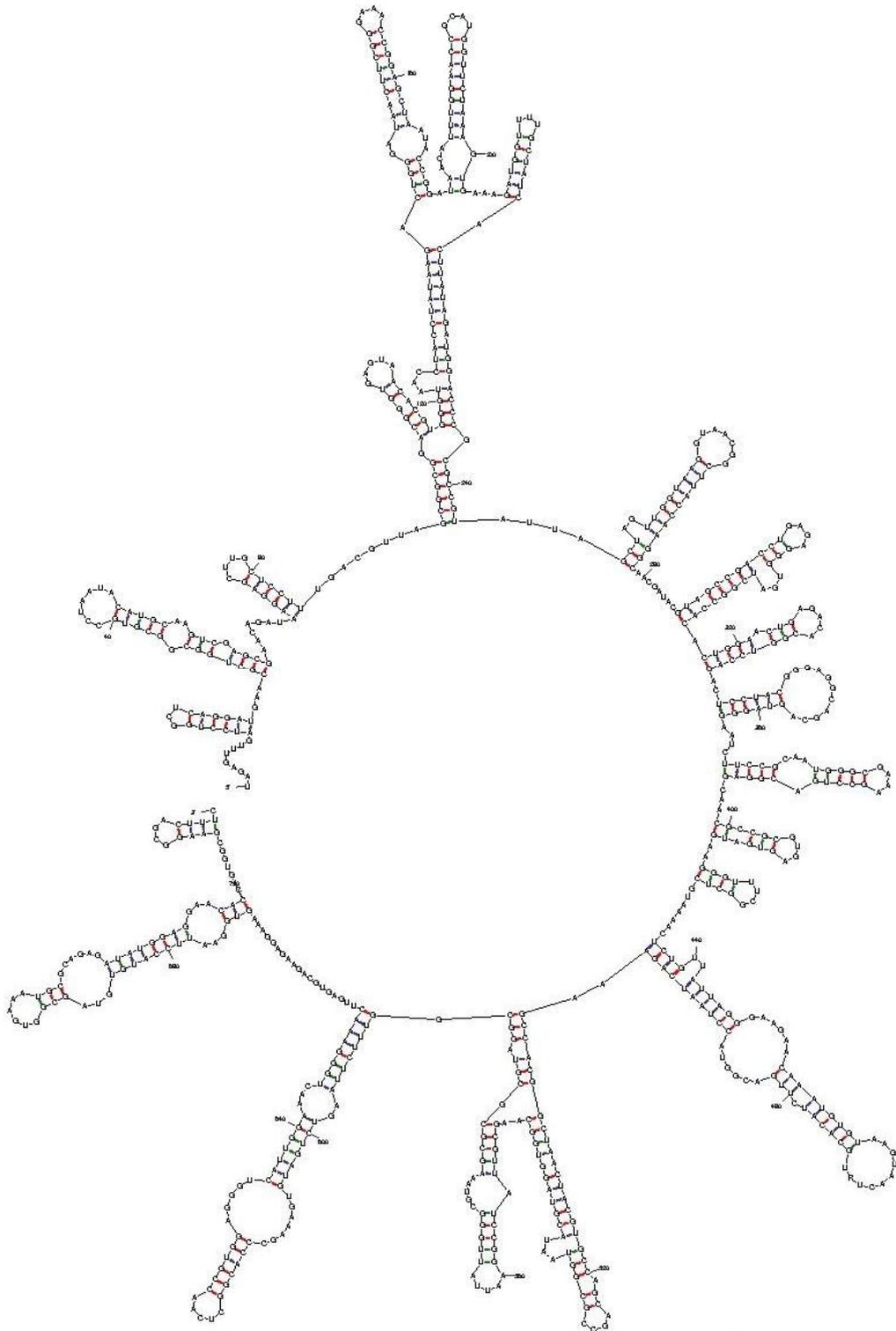
Annexe 28 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis* BAT NA



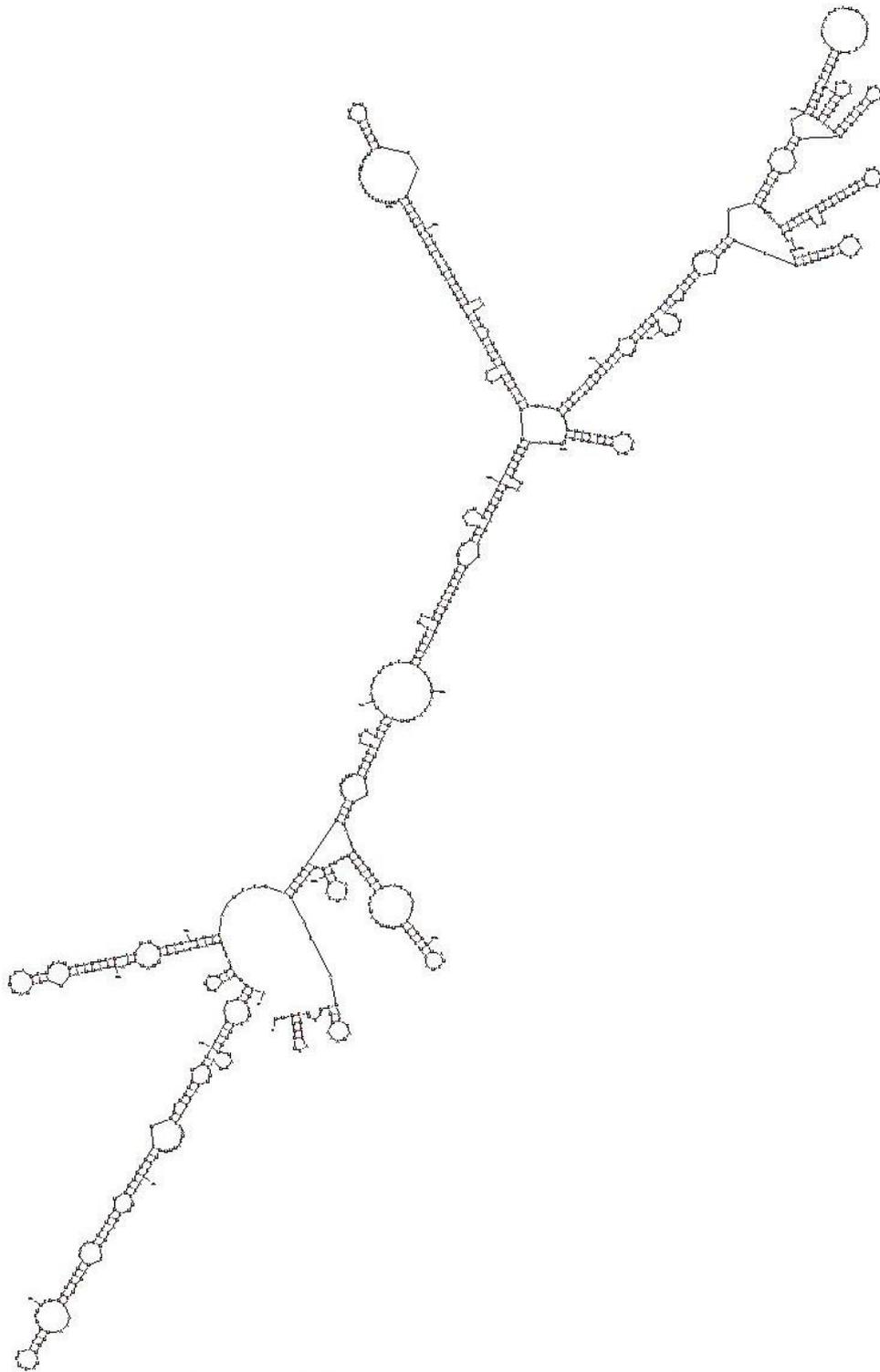
Annexe 29 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis* BAT NA



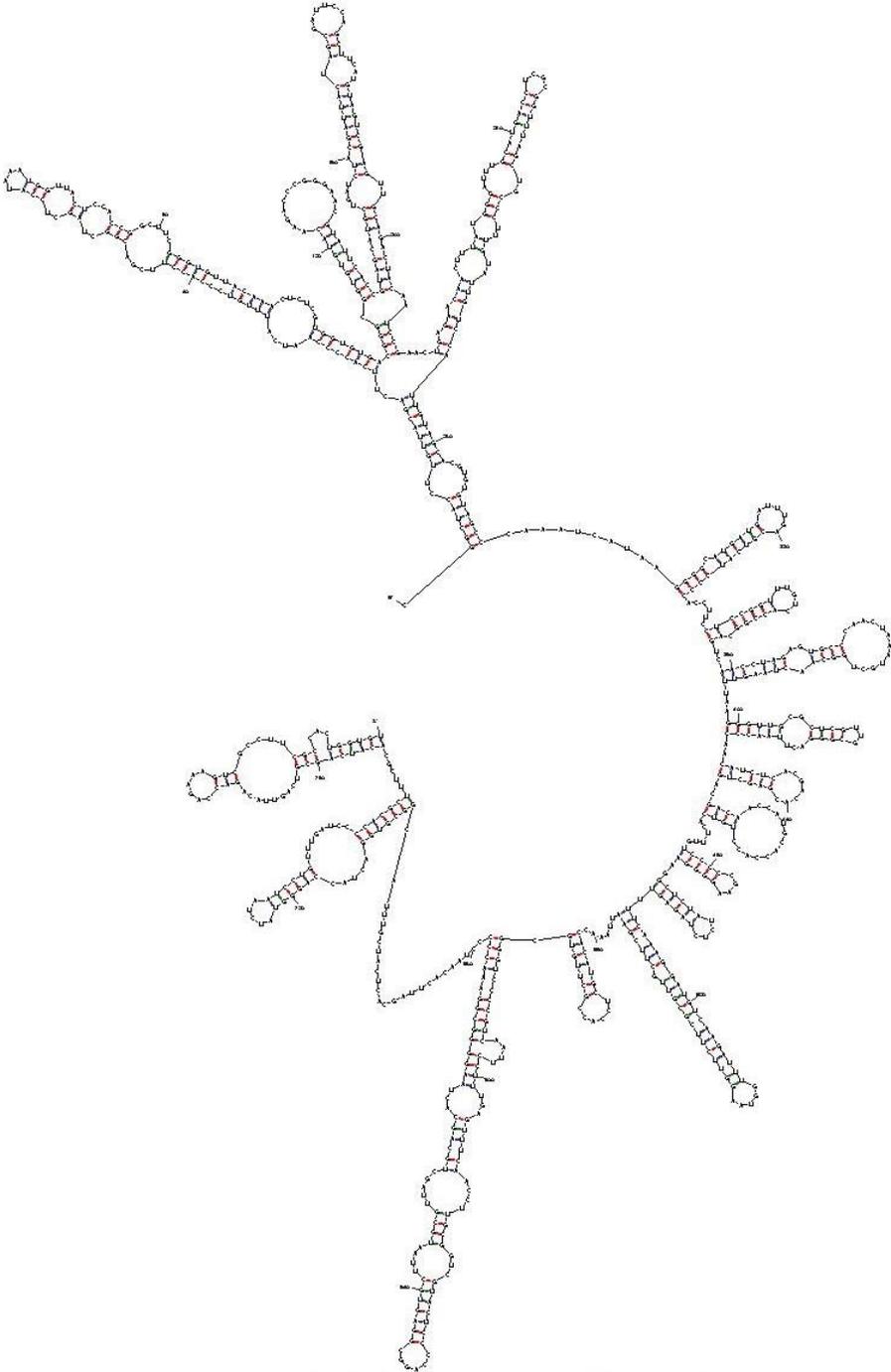
Annexe 30 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus saprophyticus* CONSTANTINE



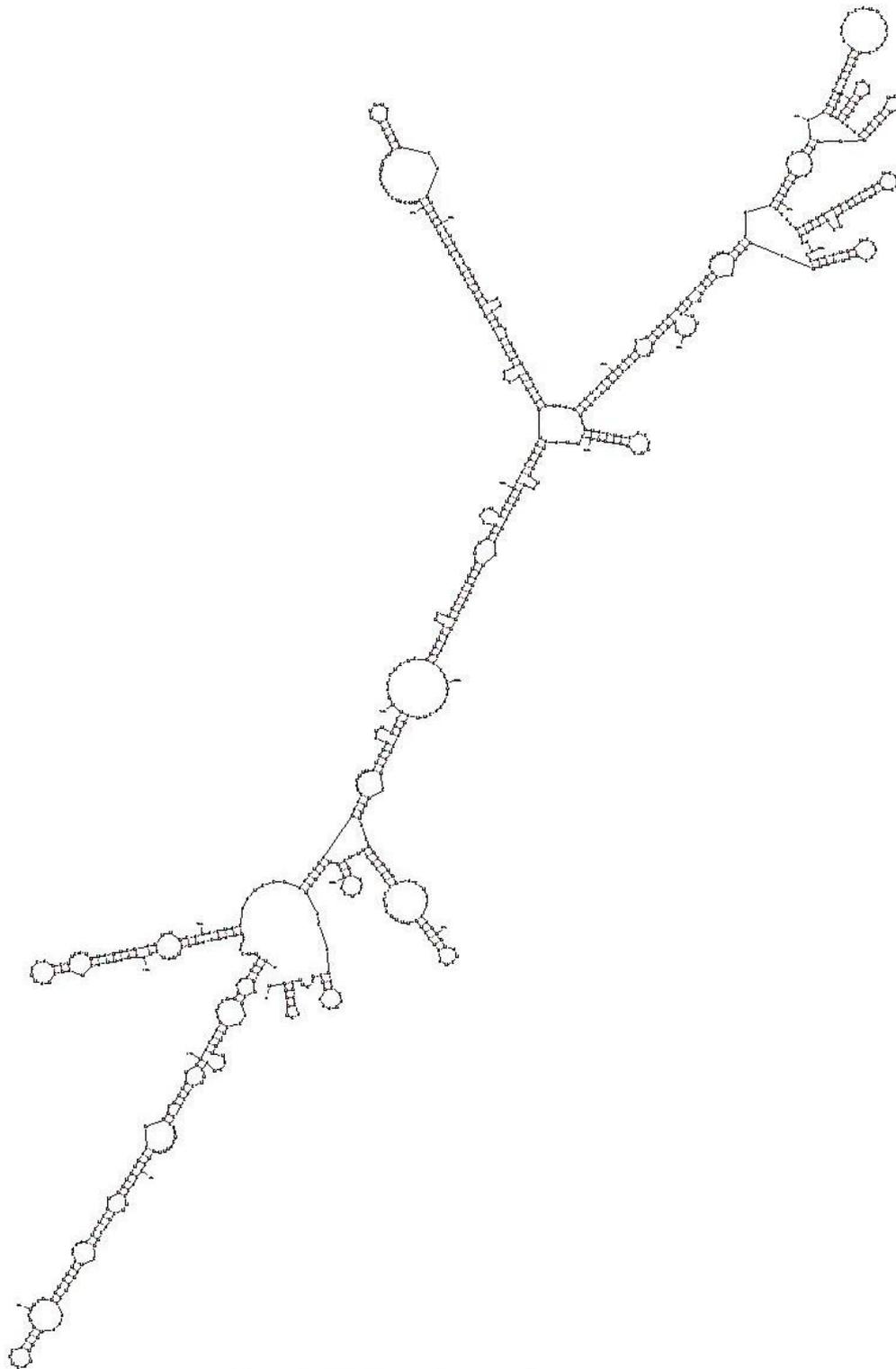
Annexe 31 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus haemolyticus* BATNA



Annexe 32 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus equorum* CONSTANTINE



Annexe 33 : Structure secondaire 2D 16S de *Staphylococcus hominis* BATNA



Annexe 34 : Concentration initiale d'ammonium Sulfate.

Initial concentration of ammonium sulfate (percentage saturation at 25°C)	Percentage saturation at 25 °C																			
	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (g) to be added to 1 l of initial solution																			
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10	0	28	57	86	118	137	190	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
15		0	28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
20			0	29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
25				0	30	49	71	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
30					0	19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
33						0	12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
35							0	31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
40								0	31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
45									0	32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
50										0	33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
55											0	33	67	103	141	179	220	264	307	353
60												0	34	69	105	143	183	227	269	314
65													0	34	70	107	147	190	232	275
70														0	35	72	110	153	194	237
75															0	36	74	115	155	198
80																0	38	77	117	157
85																	0	39	77	118
90																		0	38	77
95																			0	39

(a) : This table was based on Green and Hughes in *Methods Enzymol.* 1, 67-90 (1955).

Résumé

L'objectif de ce travail est de proposer une approche combinée (phénotypique et biomoléculaire) pour la caractérisation des *Staphylococcus* isolées des bovins.

Ces phases sont la caractérisation phénotypique classique (morphologie, biochimie et physiologie des isolats), phase génotypique par séquençage du gène 16S et une analyse protéomique des isolats par une électrophorèse SDS-PAGE ainsi que l'analyse bioinformatique des séquences 16S par prédiction des structures 2D des ARNr 16S et la détermination des liens phylogénétiques. Les souche isolées sont : *Staphylococcus haemolyticus* et *Macrocooccus brunensis*.

Mots clés: *Staphylococcus*, ARNr 16S, Structure 2D, SDS-PAGE.

Abstract

The aim of this work is to propose a combined approach (phenotypic and biomolecular) for the characterization of *Staphylococci* isolated from cattle.

These phases are the classic phenotypic characterization (morphology, biochemistry and physiology of isolates), genotypic phase sequencing of the 16S gene and proteomic analysis of isolates by SDS-PAGE electrophoresis as well as bioinformatics analysis of sequences 16S structure prediction 2D 16S rRNA and determination of phylogenetic relationships. The isolated strains are: *Staphylococcus haemolyticus* and *Macrocooccus brunensis*

Keywords: *Staphylococcus*, 16S rRNA, 2DStructure, SDS-PAGE

المخلص

الهدف من هذا العمل هو اقتراح نهج موحد (المظهرية والبيولوجية الجزيئية) لتوصيف البكتيريا المعزولة من البقر.

هذه المراحل هي التوصيف المظهري الكلاسيكي (الشكل، والكيمياء الحيوية وعلم والخصائص الفسيولوجية للعزلات)، و الوراثة للجينات S16 وتحليل البروتين من العزلات بالهجرة في الحقل الكهربائي SDS-PAGE كذلك تحليل المعلوماتية الحيوية من متواليات S 16 وتحديد علاقات النسالة .

السلالتان المعزولتان هما : *Staphylococcus haemolyticus* و *Macrocooccus Brunensis*

الكلمات المفتاحية: *Staphylococcus* ، 16S rRNA، البنية ثنائية الأبعاد ، SDS-PAGE

**INCIDENCE DE *STAPHYLOCOCCUS SP.* DANS LES AFFECTIONS BOVINES :
PRÉDICTION DES STRUCTURES 2D DU GÈNE rRNA 16S POUR LE
DIAGNOSTIC BACTÉRIEN**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

L'objectif de ce travail est de proposer une approche combinée (phénotypique et biomoléculaire) pour la caractérisation des Staphylocoques isolées des bovins.

Ces phases sont la caractérisation phénotypique classique (morphologie, biochimie et physiologie des isolats), phase génotypique par séquençage du gène 16S et une analyse protéomique des isolats par une électrophorèse SDS-PAGE ainsi que l'analyse bioinformatique des séquences 16S par prédiction des structures 2D des ARNr 16S et la détermination des liens phylogénétiques. Les souche isolées sont : *Staphylococcus haemolyticus* et *Macrococcus brunensis*.

Mots clés : *Staphylococcus*, *ARNr 16S*, *Structure 2D*, *SDS-PAGE*.

Laboratoire de recherche : Biologie cellulaire et Moléculaire

Jury d'évaluation :

Président du jury : Y. BENHIZIA (Professeur - UFM Constantine),

Rapporteur : M. A. HAMIDECHI (Professeur - UFM Constantine),

Examineur : M. GAGAOUA (Maître de Conférences A ó INATAA UFM Constantine).

Examineur : R. ALATOU (Maître de Conférences A ó UFM Constantine).

Date de soutenance : 16/06/2016