

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
قائمة 1945 ماي 8 جامعة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master.

Domaine : Sciences de la Nature de la Vie.
Filière : Sciences Biologiques.
Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire.
Département : Biologie.

Thème :

L'Extraction De l'ADN Génomique De Bactéries Isolées À Partir Du Lait De Vache Cru

Présenté par :

- **Baali Meriem Yasmin.**
- **Manaa Manel.**
- **Sanaa Ahlam.**
- **Soufi Sohaib.**

Devant le jury composé de :

Président : Pr. Benouareth Djamel	Université 8 Mai 1945 Guelma.
Examinatrice : Dr. Abdaoui Wissam	Université 8 Mai 1945 Guelma.
Encadrant : Pr. Souiki Lynda	Université 8 Mai 1945 Guelma
Co-encadrant : Doctorante Laouar Meriem	Université Badji Mokhtar Annaba

2021/2022

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce travail

En second lieu, je tiens à remercier mon encadreur.

Dr. LAOUAR MARIEM et Pr. SOUIKI LINDA pour son attention de tout instant sur mon travail,

Pour ses conseils avisés, son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de ce travail.

Mon vif remerciement au Pr BENOURATH DJAMAL A pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Au Dr. ABDAOUI WISSAM d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé pendant la réalisation de mon projet.

Dédicaces

Avant tout et en premier lieu, je remercie le Dieu Tout-Puissant pour la force qu'il m'a donnée pour dépasser toutes les difficultés lesquelles j'ai passé durant mon parcours

*Avec une joie immense que je dédie ce mémoire principalement à mes chers parents pour leurs affections inépuisables papa Rabi yarhmo .
Ceux qui ils n'ont pas cessé de prier pour moi durant mon cursus scolaire
Et m'ont encouragé depuis toujours.*

*Je tiens à remercier profondément mes encadrant Madame **LAOUAR MERIEM** et Madame **SOUIKI LINDA** pour sa générosités et Pour le grand effort qu'ils ont fait pour nous,*

*A mes sœurs, que Dieu me les garde,
A mes amis, lesquels, je leur souhaite du succès dans la vie professionnelle.*

MANEL

Dédicaces

*A ma chère mère MARICHA et A mon cher père ARBI, source de vie,
a d'amour et d'affection*

*A ma sœur RIMA et leurs enfants BARA, et mon mari et mon fils b
sources de joie st de bonheur*

A toute ma famille, source d'espoir et de motivation

A tous mes amis, tout particulièrement manel , chahra .

A vous cher lecteur

AHLAM

Dédicaces

Avant tout et en premier lieu, je remercie le Dieu Tout-Puissant pour la force qu'il m'a donnée pour dépasser toutes les difficultés lesquelles j'ai passé durant mon parcours

*Avec une joie immense que je dédie ce mémoire principalement à mes chers parents pour leurs affections inépuisables. Ceux qui ils n'ont pas cessé de prier pour moi durant mon cursus scolaire
Et m'ont encouragé depuis toujours.*

*Je tiens à remercier profondément mes encadrant Madame **LAOUAR** et madame **SOUIKI** pour sa générosités et Pour le grand effort qu'ils ont fait pour nous,*

*A mes frères et sœurs et mes cousines et ma grand-mère Rabi yarhamha ,
que Dieu me les garde,*

A mes amis, lesquels, je leur souhaite du succès dans la vie professionnelle.

YASMINE

Dédicaces

Avant tout et en premier lieu, je remercie le Dieu Tout-Puissant pour la force qu'il m'a donnée pour dépasser toutes les difficultés lesquelles j'ai passé durant mon parcours

*Avec une joie immense que je dédie ce mémoire principalement à mes chers parents pour leurs affections inépuisables. Ceux qui ils n'ont pas cessé de prier pour moi durant mon cursus scolaire
Et m'ont encouragé depuis toujours.*

*Je tiens à remercier profondément mes encadrant Madame **LAOUAR** et madame **SOUIKI** pour sa générosités et Pour le grand effort qu'ils ont fait pour nous,*

*A mes frères et sœurs, que Dieu me les garde,
A mes amis, lesquels, je leur souhaite du succès dans la vie professionnelle.*

SOHAIB

Résumé

Les caractères génétiques de tout être vivant sont portés par la molécule d'ADN. Il renferme toutes ses caractéristiques.

Chez les bactéries, l'étude de l'ADN chromosomique permet de se renseigner sur le phénomène de résistance aux antibiotiques et de mutations qui lui permettent de s'adapter à la présence de ces molécules.

L'objectif de ce travail est l'extraction de l'ADN chromosomique bactérien issu de cellules isolées de lait de vache cru par la méthode Na Cl.

Des antibiogrammes et des tests complémentaires pour vérifier la transmission de gènes de résistances ont aussi été réalisés pour les bactéries *E.coli*, *Salmonella* sp et *S.aureus*.

Mots clés : Extraction d'ADN, les Bactéries, la lyse, Na Cl, salting out.

Abstract

The genetic characteristics of all living beings are carried by the DNA molecule. It contains all its characteristics.

In bacteria, the study of chromosomal DNA provides information on the phenomenon of resistance to antibiotics and mutations that allow it to adapt to the presence of these molecules.

The objective of this work is the extraction of bacterial chromosomal DNA from cells isolated from raw cow's milk by the Na Cl method.

Antibiograms and additional tests to verify the transmission of resistance genes were also carried out for *E.Coli*, *Salmonella sp* and *S.aureus* bacteria.

Key words: DNA extraction, bacteria, lysis, Na Cl, salting out.

ملخص

يحمل جزيء الحمض النووي الخصائص الجينية لجميع الكائنات الحية. يحتوي على كل خصائصه.

في البكتيريا ، توفر دراسة الحمض النووي للكر وموسومات معلومات عن ظاهرة مقاومة المضادات الحيوية والطفرات التي تسمح لها بالتكيف مع وجود هذه الجزيئات.

الهدف من هذا العمل هو استخراج DNA الكر وموسومات البكتيري من الخلايا المعزولة من حليب البقر الخام بطريقة NaCl.

كما تم إجراء اختبارات المضادات الحيوية واختبارات إضافية للتحقق من انتقال الجينات المقاومة لبكتريا *E.*

Coli و *Salmonella sp* و *S.aureus*.

كلمات مفتاحية، التملح، كلوريد الصوديوم، التحلل، البكتيريا، استخراج الحمض النووي

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

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

Chapitre I : Revue bibliographique.

I. Généralités

1. L'acide désoxyribonucléique ADN.....	2
1.1. Historique.....	2
1.2. Structure et morphologie.....	2
1.2.1. Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques.....	3
1.2.2. Structure de l'ADN.....	4
1.3. Nature des régions variables de l'ADN.....	4
1.4. Les différents types d'ADN.....	4
1.5. Les éléments transposables.....	5
1.6. Réplication de l'ADN.....	5
1.7. Transmission de l'ADN bactérien.....	5
1.8. Mutation de l'ADN.....	6
1.8.1. Les agents mutagènes.....	6
A. Les agents physiques.....	7
B. Les agents chimiques.....	7
C. Les agents directs.....	7
D. Mutagène indirect.....	7
1.8.2. Mécanismes de réparation de l'ADN.....	8
2. Les systèmes de réparation de la molécule d'ADN.....	9
3. L'importance clinique des mécanismes de réparation de l'ADN.....	9
4. Banques Génomiques représentatives.....	9
4.1. Le séquençage de l'ADN.....	9
4.2. Amplification en chaîne par polymérase (PCR).....	10
5. Les plasmides.....	10
5.1. Les différents types de plasmides.....	10
5.1.1. Plasmides conjugatifs.....	11
5.1.2. Plasmides de résistance.....	11
5.1.3. Plasmides métaboliques.....	11
5.1.4. Plasmides de virulence.....	11
6. Les bactéries.....	11
6.1. Historique.....	11

6.2. Définition.....	11
7. les bactériophages.....	12
II. Méthodes d'extraction de l'ADN et réalisation d'antibiogrammes.....	13
a) Les techniques d'extraction de l'ADN.....	13
1. Historique.....	13
2. L'extraction de la molécule d'ADN.....	14
2.1. La méthode classique.....	14
2.2.Méthode d'extraction par l'utilisation du phénol et du chloroforme	14
2.3.Méthode saline ou <i>salting out</i>	14
2.4.Extraction par colonne échangeuse d'ions.....	14
2.5.Les kits commercialisés.....	15
2.6. La méthode automatisée.....	15
A. La lyse des cellules.....	15
B. Lyse mécanique.....	15
C. Lyse chimique.....	15
3. l'utilité de l'extraction de la molécule d'ADN.....	16
4. Contrôle de pureté de l'ADN extrait.....	16
4.1. Quantification des acides nucléiques.....	16
5. Electrophorèse des échantillons d'ADN.....	16
b) étude du phénomène de résistance aux antibiotiques.....	17
1. Définition des antibiotiques.....	17
2. Les Familles d'antibiotiques.....	17
3. L'Origine des antibiotiques.....	17

Chapitre II : Expérimentale

A) Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique.....	19
1. Isolement des souches.....	19
2. Le repiquage des souches.....	19
3. Mise en culture des bactéries.....	20
4. Identification des bactéries par coloration de Gram.....	21
4.1.Catalase.....	21
4.2.Oxydase.....	21
4.3.Réalisation des antibiogrammes.....	22
4.4. Conservation des souches.....	22
5. Test de vérification de la potentielle transmission de gènes entre les bactéries.....	23
6. Extraction de l'ADN par la méthode de Na Cl.....	24
6.1.Méthodes d'extraction de l'ADN génomique.....	24
6.2. Principe.....	24
6.3.Dosage et évaluation de la pureté des échantillons d'ADN obtenus....	26
7. Détermination de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité...	26
7.1.Détermination de la concentration de l'ADN.....	26
7.2.Pureté de l'ADN.....	27

B) Résultats et Discussion

1. Culture des bactéries.....	28
2. Résultats des antibiogrammes.....	28
3. Résultats des tests d'orientation.....	29
4. Résultats du test de la transmission des gènes de résistance.....	30
5. Résultats de l'extraction de l'ADN Chromosomique.....	31
6. Evaluation du degré de pureté des échantillons d'ADN obtenues et Dosage.....	31
7. Test de vérification de la potentielle transmission de gènes entre les bactéries.....	33
Conclusion.....	35
Références bibliographiques.....	36
Annexes	
Glossaire	

Liste des abréviations

A260/A280 : rapport de densité optique.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

ATB : Antibiotique.

DO: Densité Optique.

EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique

F - : absence de facteur de fertilité

F+ : présence de facteur de fertilité

H Cl: Acide chlorhydrique.

HFR : Haute fréquence de recombinaison

LB : Luria-Bertani.

MH : Muller-Hinton.

Na Cl : Chlorure de Sodium.

Na OH : hydroxyde de sodium.

R : Résistance.

Pb: Paires de bases.

TBE: Tris borique EDTA.

TE : Tris – EDTA.

Tm : Température de fusion.

Tris: tris aminométhane.

Tr/min : Tour, par minute.

SDS : dodecyl sulfate de sodium.

Liste des figures

Figure 01 : structure de L'ADN.....	2
Figure 02 : Schéma représentant l'ADN.....	3
Figure 03 : Réplication de l'ADN.....	5
Figure 04 : Les mutations de l'ADN et la variabilité génétique.....	6
Figure 05 : Désamination de la cytosine en uracile par un acide nitré.....	7
Figure 06 : ADN psalmodique circulaire.....	10
Figure 07 : La structure d'une cellule bactérienne.....	12
Figure 08 : Structure d'un bactériophage.....	13
Figure 09 : Les souches bactériennes utilisées.....	19
Figure10 : Réalisation de l'ensemencement.....	20
Figure 11 : les différentes étapes de la réalisation d'un frotti.....	21
Figure 12 : les étapes d'une réalisation du test catalase.....	21
Figure 13 : les étapes d'une réalisation du test Oxydase.....	22
Figure 14 : La réalisation d'un antibiogramme.....	22
Figure 15 : Ajustement du pH par HCL.....	23
Figure 16 : spectrophotomètre.....	26
Figure 17 : test de transfert des gènes.....	30
Figure 18 : Résultat de la précipitation de l'ADN.....	31

Liste des tableaux :

Tableau 01: Le déférent système de réparation.....	8
Tableau 02 : Principaux antibiotique classés selon leur site d'action.....	18
Tableau 03: Milieux spécifiques des souches pathogènes étudiées.....	20
Tableau 04: L'examen de coloration de Gram et son but.....	20
Tableau 05 : les valeurs acceptables du ratio (260/280) pour un ADN pur.....	27
Tableau06 : Les résultats d'antibiogramme.....	28
Tableau 07: résultats de la coloration de Gram, du test de la catalase et de l'oxydase.....	30
Tableau 08 : Résultats de la transmission de gènes de résistance entre les espèces....	30
Tableau 09: Les densités et rapport de l'évaluation de la pureté des échantillons d'ADN.....	31
Tableau 10 : Dosage de l'ADN dans les échantillons.....	33

Introduction

Introduction :

La biologie moléculaire est une discipline scientifique au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire ;

La connaissance de tout être vivant, procaryote ou eucaryote, animal ou végétal, nécessite l'exploration de son patrimoine génétique par différentes techniques de biologie moléculaire.

Parmi cette catégorie de microorganismes existent les bactéries « pathogènes », ces dernières sont responsables de maladies. L'étude du génome microbien grâce à la biologie moléculaire permet de mieux comprendre certains mécanismes (cataboliques, anaboliques, résistances à certaines molécules xénobiotiques...etc.).

En effet, l'extraction de l'ADN bactérien est la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire. L'isolement du matériel génétique (ADN) à partir des cellules eucaryotes et procaryotes requiert la réalisation de plusieurs étapes.

Il existe différentes techniques d'extraction d'ADN mais elles ont toutes le même principe de base. L'extraction de l'ADN et l'étude du génome microbien permet d'une part de mieux comprendre les processus intervenant dans la résistance aux ATB, mais aussi, la réalisation de tests complémentaires (réalisation d'antibiogrammes et tests permettant de vérifier la transmission de gènes entre les espèces) est nécessaire pour comprendre d'avantage ce phénomène.

L'objectif de ce travail fut d'extraire, par la méthode d'Na Cl, l'ADN chromosomique bactérien à partir de souches isolées de lait de vache cru, de pus et d'urines, ainsi que la réalisation d'antibiogrammes pour vérifier la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis de certaines molécules d'antibiotiques et la potentielle transmission de gènes de résistance entre les espèces étudiées.

Chapitre 1

I. Généralités

1. L'acide désoxyribonucléique ADN

1.1. Historique

En 1952, Alfred Hershey et Martha Chase confirmèrent que l'ADN est le matériel génétique et une année plus tard, en se fondant sur les analyses aux rayons X de Rosalind Franklin et Maurice Wilkins, Francis Crick et James Watson firent la célèbre description de sa structure. (Yee *et al.*, 2008).

Le 25 avril 1953, un article de James Watson et Francis Crick publié dans la revue Nature [révolutionne](#) la biologie et la médecine. Il démontre la structure à double hélice de l'acide désoxyribonucléique (ADN), permettant de comprendre l'ensemble du fonctionnement génétique des êtres vivants. De cette découverte en découleront d'autres qui deviendront indispensables. (Khorana, 1961; Nirenberg *et al.*, 1961).

1.2. Structure et morphologie

L'ADN est une molécule bi-caténaire. Chaque brin est composé d'une molécule de sucre (le désoxyribose), d'un acide phosphorique, et de l'une des quatre bases azotées constituant l'ADN. Ce qui forme les marches de l'escalier. (Karp, 2004).

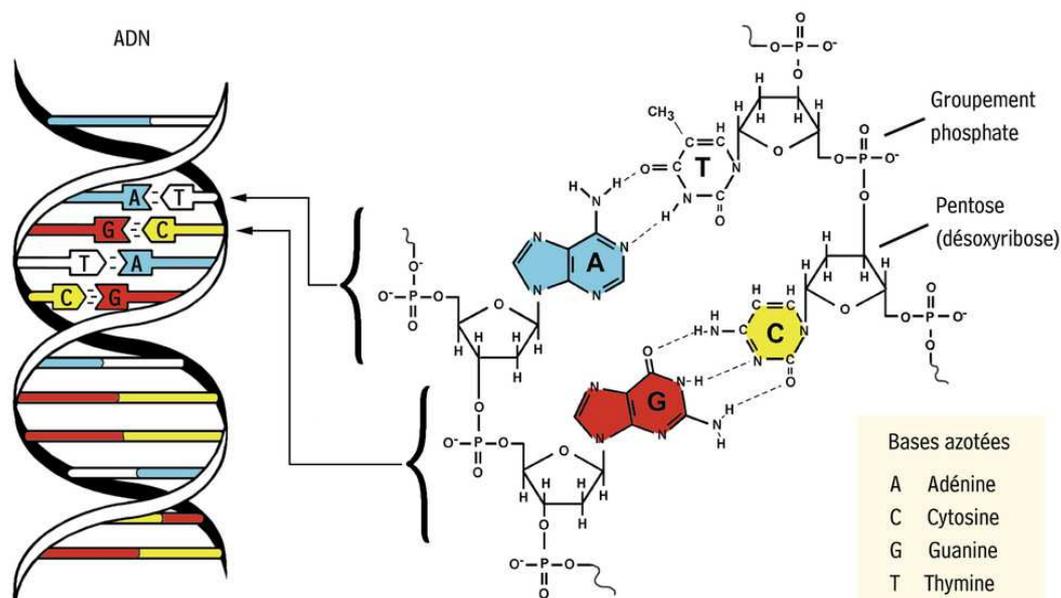


Figure 01 : Structure de L'ADN. [1]

➤ Nucléotides

Un nucléotide est une molécule organique qui composée d'un base nucléique d'un ose à cinq atome de carbone et à trois groupement phosphate. (Turner *et al.*, 1999).

L'ADN est le support de l'information génétique. (Avery *et al.*, 1944). L'étude de toute forme de vie passe donc par l'étude structurale et fonctionnelle de cette molécule. (Griffith *et al.*, 2001).

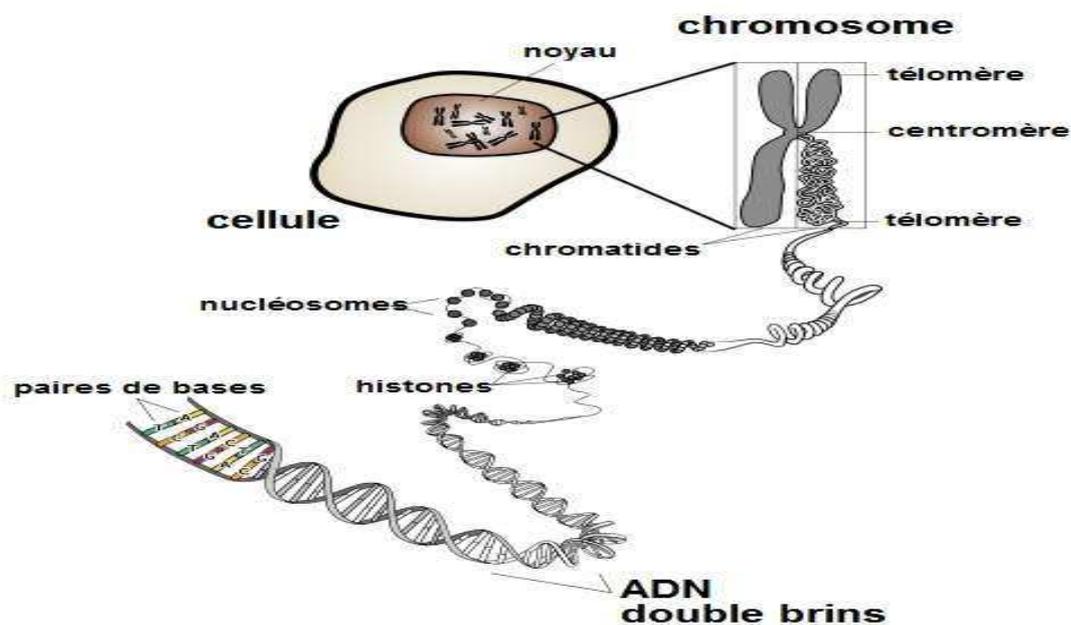


Figure 02 : Schéma représentant l'ADN. [2]

Localisation de chromosome Au niveau des cellules eucaryotes dans le noyau, tandis que chez cellules procaryotes. (François *et al.*, 2007).

1.2 .1. Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques

Propriétés importantes pour l'isolation et l'étude des acides nucléiques.

- ✓ **Stabilité:** Liaisons H = spécificité de l'appariement des bases.
 - * Interactions hydrophobes et aromatiques.
- ✓ **Solubilité :** solubles dans le phénol, les solutions salines et alcalines.
 - * Précipités par l'alcool et les solutions acides fortes.
 - * En solution aqueuse, ils sont très acides.
- ✓ **Viscosité :** ADN long et mince donc solution très visqueuse.

- ✓ **Densité** : environ 1,7 g/cm³, isolation possible sur gradient de Césium.
- ✓ **Dénaturation** : chimique par l'urée ou la forme amide.
 - *thermique : ARN dénaturation progressive à la Chaleur.
 - *ADN dénaturation à une température précise (T_m).
Dépendant du contenu.
 - * en G-C (propriété ayant permis la création de la PCR) (A.U. 2019/2020).

1.3. Nature des régions variables de l'ADN

Le génome des cellules eucaryotes contient un type de séquences appelé ADN satellite; cet ADN contient une unité de répétition, Composée d'un à 250 nucléotides environ. L'ADN satellite a subi un taux de mutations très élevé au cours de l'évolution et a même changé d'emplacement sur les chromosomes. Cette sensibilité aux mutations peut être attribuée à différents facteurs. (Ronald, et al., 2002).

1.4. Les différents types d'ADN

L'ADN peut être retrouvé sous deux formes :

L'ADN bi-caténaire (ou double brin) : qui est une molécule d'acide D-désoxyribonucléique (ADN) .Deux chaînes complémentaires et antiparallèles sont enroulées l'une sur l'autre vers le côté hélicoïdal droit.

L'ADN monocaténaire (ou simple brin) : définit une molécule d'acide nucléique (ADN) non appariée à une autre molécule. (DOUAOUDI H, 2019).

1.5. Les éléments transposables

Les éléments transposables (ou transposons) sont des séquences mobiles d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui sautent d'un endroit du génome à un autre (transposition) .La cause de la transposition n'est pas clairement connue.(Ronald, 2002).

1.6. Réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN, aussi appelée duplication de l'ADN, est le processus au cours duquel l'ADN est synthétisé. Ce mécanisme permet d'obtenir, à partir d'une molécule d'ADN, deux molécules identiques à la molécule initiale.

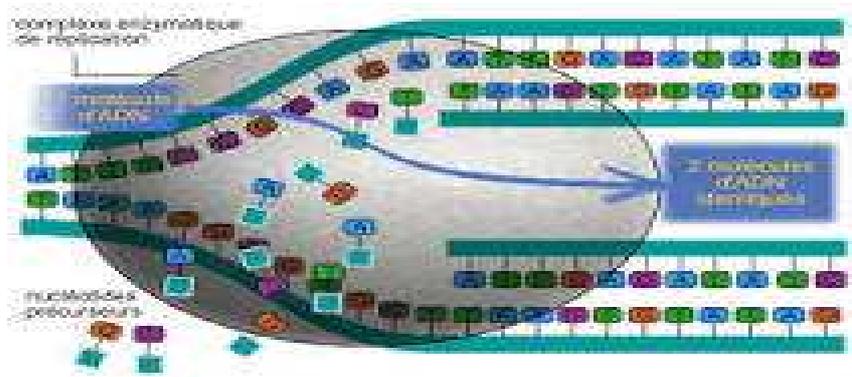


Figure 03: Réplication de l'ADN [3]

1.7. Transmission de l'ADN bactérien

Les bactéries se multiplient par fission binaire, de manière asexuée. Une cellule mère va donner deux cellules filles génétiquement identiques, ainsi le brassage génétique est pratiquement inexistant. Pour pallier à cela, il existe 3 mécanismes majeurs de transfert horizontal des gènes :

1. la transformation : incorporation d'un ADN nu présent dans l'environnement directement dans la bactérie.
2. la transduction : transfert du matériel génétique d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un phage.
3. la conjugaison : transfert de l'ADN d'une bactérie à une autre par contact direct.

1.8. Mutation de l'ADN

Les mutations sont des altérations permanentes et héréditaires touchant la base de l'ADN. Elles émergent soit des erreurs spontanées dans la réplication de l'ADN ou de la recombinaison méiotique, ou comme conséquence des effets d'altération des agents physiques et chimiques sur l'ADN. (Francis *et al.*, 2013).

- *Mutation ponctuelle
- *Mutation transition
- *Mutation transversion
- *Mutation silencieuse
- *Mutation faux-sens
- *Mutation non-sens

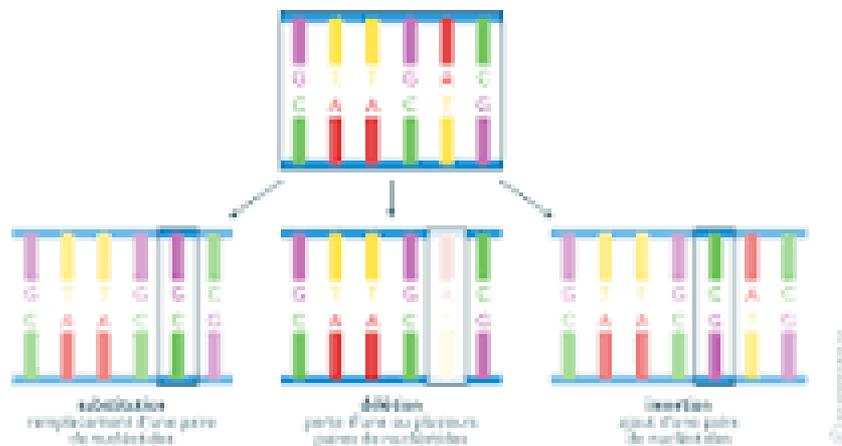


Figure 04: Les mutations de l'ADN et la variabilité génétique. [4]

1.8.1. Les agents mutagènes

A. Les agents physiques

La radiation par ionisation (rayons X et rayons γ) et la non ionisation (rayons U.V.) produit une variété de lésions au niveau de l'ADN, produit des dimères pyrimidines à partir des bases adjacentes de pyrimidines. (Francis et al., 2013).

B. Les agents chimiques

Les analogues de base peuvent se mésappairer durant la réplication de l'ADN provoquant ainsi des mutations. Les agents alkylants et arylants génèrent une variété de produits d'addition, susceptibles de bloquer la transcription et la

réplication, ou plus fréquemment, indirecte. La plupart des mutagenèses chimiques sont carcinogènes. . (Francis *et al.*, 2013).

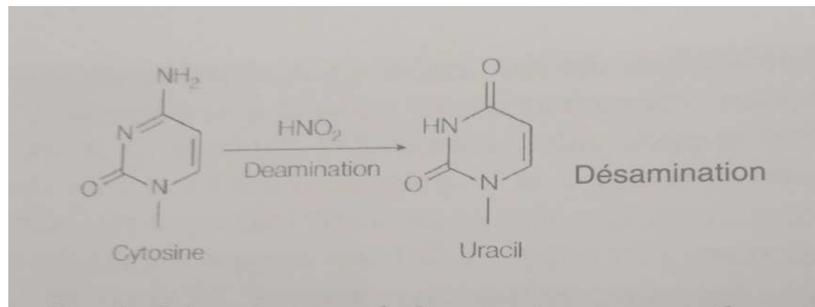


Figure 05 : Désamination de la cytosine en uracile par un acide nitré. (Francis *et al.*, 2013).

C. Les agents directs

Si un analogue de base ou la base modifiée, dont les propriétés d'appariement sont différentes de la base du parent, n'a pas été rectifiée par le mécanisme de réparation de l'ADN avant le passage d'une fourche de réplication, une base incorrecte sera alors incorporée. Un second tour de réplication fixe la mutation de manière permanente dans l'ADN. (Francis *et al.*, 2013).

D. Mutagène indirect

La majorité des lésions au niveau de l'ADN est réparée grâce à l'inversion directe sans erreur, ou aux mécanismes de réparation par excision avant le passage d'une fourche de réplication. Si cela n'est pas possible, la synthèse de l'ADN translation a lieu. Celle-ci incorpore la /les base(s) incorrecte(s) dans le sens inverse de la lésion. La correction sur épreuves peut être supprimée au cours de ce processus. . (Francis *et al.*, 2013).

2. Les systèmes de réparation de la molécule d'ADN

La molécule d'ADN est perpétuellement soumise à des dommages des cassures doubles. Tous ces dommages sont réparés par différents mécanismes qui sont généralement spécialisés pour un (ou plusieurs) type(s) de dommages. Quatre voies de réparation de l'ADN corrigent ces dommages :

*La réparation par excision de nucléotide (NER pour Nucléotide Excision Repaire),

*La réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair),

*La réparation des mésappariements (MMR pour Mis Match Repaire).

* La réparation de cassures double brin (DSBR pour Double Strand Break Repaire).

Il est important de signaler que ces mécanismes de réparation sont distincts de Pa rôleurs facteurs (protéines) impliqués. Cependant, le NER, le BER et le MMR utilisent des étapes moléculaires présentant des similitudes (excision, synthèse).

Tableau 01:Le déférent système de réparation

<i>Altération</i>	<i>Facteurs</i>	<i>Réparation</i>
Perte d'une base (création d'un site AP <small>apyrimidique ou apurinique</small>)	Induit, 1100 fois par jour	→ Excision-réparation de base
Désamination (perte de -NH ₂)	Induit à cause de l'instabilité de ces groupes	→ Correction des erreurs d'appariement → Excision-réparation du nucléotide
Hydroxylation (ajout de -OH)	Rayons X Rayons gamma Produits chimiques	→ Excision-réparation du nucléotide
Alkylation ou méthylation	Donneurs présents dans la cellule	→ Excision-réparation de base
Dimères T-T ou C-C	Rayons UV	→ Réparations post-réplcatives
Mauvaise séquence	Induit, erreurs dans la réplcation de l'ADN	→ Correction des erreurs d'appariement
Coupures des brins	Radiations ionisantes	→ Excision-réparation du nucléotide

3. L'importance clinique des mécanismes de réparation de l'ADN

Ataxie-télangectasie

L'ataxie-télangiectasie est probablement due à des anomalies des enzymes responsables de la réparation de l'ADN. (Ronald, 2002).

4. Banques Génomiques représentatives

Les banques géniques constituées d'ADN génomique sont appelées « banques génomiques » et celles constituées d'ADN complémentaire sont appelées banques d'ADN complémentaire. Ces dernières ne possèdent pas de séquences génomiques non transcrites (séquences répétitives, etc....). Les bonnes banques géniques sont représentatives de la matière de départ et n'ont pas perdu certaine séquence provoquée par les artefacts de clonage. (Francis *et al.*, 2013).

4.1. Le séquençage de l'ADN

Les deux principales méthodes connues sont :

La méthode de Maxam et Gilbert (méthode chimique) : au cours de laquelle l'ADN marqué est soumis à des réactions de clivage spécifique des bases avant d'être soumis à une séparation par gel.

Le séquençage de Sanger (méthode enzymatique) : Cette dernière utilise des démaillages de molécules générées par l'extension polymérase d'une amorce. (Francis *et al.*, 2013).

4.2. Amplification en chaine par polymérase (PCR)

L'amplification en chaine par polymérase est utilisée dans le but d'amplifier une séquence d'ADN en utilisant une paire d'amorces (oligonucléotides). Chaque amorce complète une extrémité de la séquence cible de l'ADN. Celles-ci sont allongées l'une vers l'autre par une ADN polymérase thermostable (la taq polymérase) dans un cycle de réaction à trois étapes : la dénaturation, l'annelage de l'amorce et la polymérisation. (Francis *et al.*, 2013).

5. Les plasmides

Le terme plasmide fut introduit par le biologiste moléculaire américain Joshua en 1952, (Joshua, 1952). Un plasmide porte un ensemble de gènes permettant sa propre répllication. Ces gènes sont fréquemment des gènes d'[antibiorésistance](#) qui apportent un avantage aux bactéries qui les contiennent.

La plupart des plasmides sont des **molécules d'ADN** circulaires double-brin, beaucoup plus petite qu'un chromosome : de 3000 à 100000 paires de bases (N.B: il existe des plasmides linéaires).

Ce sont des unités de réplication autonome. Les plasmides possèdent leur propre origine de réplication et se répliquent toujours de manière indépendante du chromosome bactérien. C'est cependant la machinerie de la cellule qui assure leur réplication.

Les plasmides peuvent coder pour diverses fonctions mais sont optionnels pour la cellule qui les renferme, autrement dit : ils ne sont pas indispensables au métabolisme de la cellule dans des conditions normales de croissance. [5]

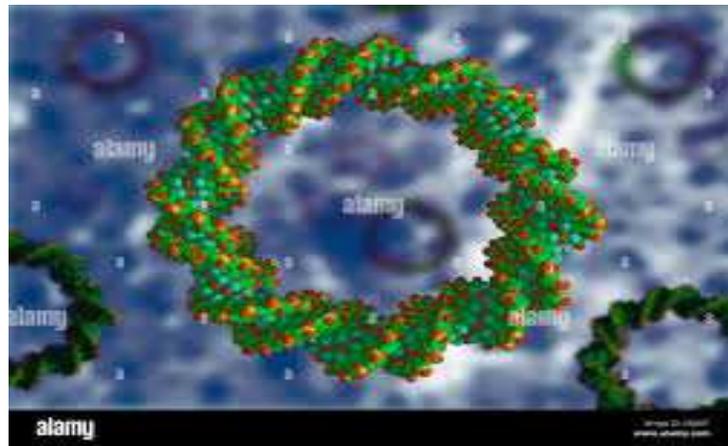


Figure 06 : ADN psalmodique circulaire. [5]

Ils sont exclusivement retrouvés chez les bactéries mais peuvent être retrouvés chez d'autres micro-organismes : le plasmide 2Mu est présent chez l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger), un eucaryote unicellulaire.

5.1. Les différents types de plasmides

5.1.1. Plasmides conjugatifs

Ces plasmides confèrent à la bactérie hôte la capacité de synthèse de pili sexuels. Par l'intermédiaire de ces pili, la bactérie porteuse (donneuse) peut transférer une copie du plasmide **F** par processus de conjugaison bactérienne. [5]

5.1.2. Plasmides de résistance

Codent des résistances aux antibiotiques et aux métaux lourds. Ces plasmides peuvent protéger la cellule par différents moyens (la modification de la cible, la résistance enzymatique ...etc.). [5]

5.1.3. Plasmides métaboliques

Les plasmides métaboliques portent des gènes permettant l'utilisation de certains nutriments. . La plupart de ces plasmides codent la synthèse d'une ou de plusieurs enzymes. [5]

5.1.4. Plasmides de virulence

Les plasmides de virulence portent des gènes codant des facteurs de virulence, ayant un rôle dans le pouvoir des bactéries.

6. Les bactéries

6.1. Historique

Ces micro-organismes furent tout d'abord classés dans le règne végétal. Les bactéries sont des micro-organismes vivants, au même titre que les virus et les champignons. Elles ont été découvertes à la fin du 17^{ème} siècle par Antoni Van Leeuwenhoek, naturaliste hollandais, qui inventa la microscopie. **(Delarras, 1981).**

6.2. Définition

La bactérie est un micro-organisme, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. **(Delarras et al., 2010).** Elles sont omniprésentes, elles vivent dans notre organisme et dans notre environnement.

(Jeannesson E, 2007).

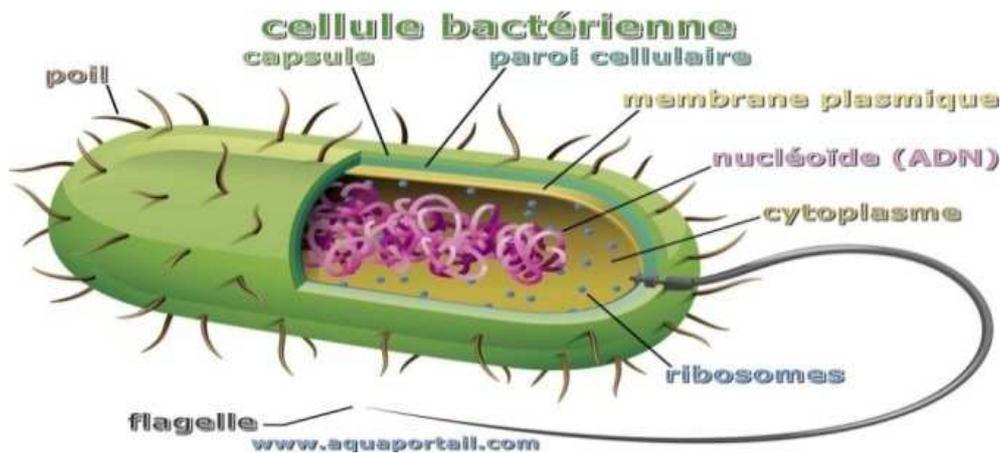


Figure 07 : Structure d'une cellule bactérienne. [6]

Les bactéries sont divisées en plusieurs catégories :

*Les bactéries commensales : l'espèce commensale tire profit de son hôte, sans lui causer de problèmes

*Les bactéries saprophytes : sont des hôtes habituels de notre corps, qui sont sans danger.

*Les bactéries pathogènes (opportunistes et spécifiques) :

- Opportunistes : peut provoquer une maladie à la suite d'une diminution des défenses de l'organisme. **(Gamille, 2006)**.

- Spécifiques : provoquent des maladies spécifiques **(Gamille, 2006)**.

7. Les bactériophages

Les bactériophages font partie des virus. Ils ont le mode classique de reproduction de l'ensemble des virus qui ne peuvent se multiplier qu'aux dépens de cellules vivantes qu'ils parasitent. **(Dublanche, 2017)**, et les archées **(Yee et al., 2019)**, et n'ont pas d'impact sur les tissus humains **(Hamzeh, 2014)**.

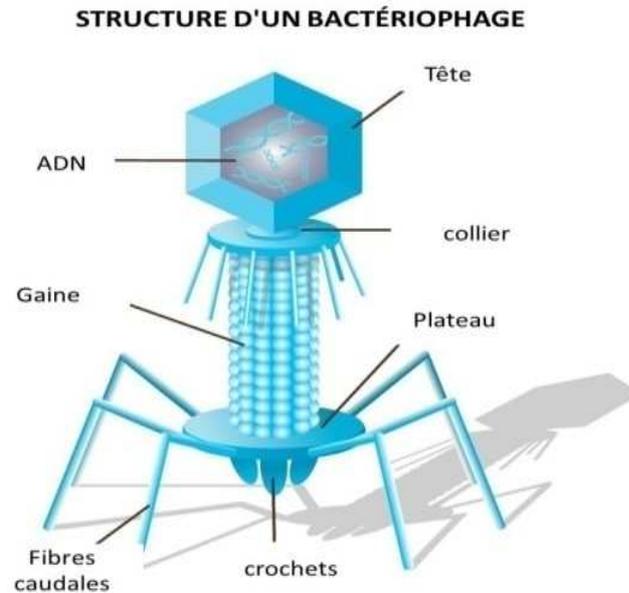


Figure 08 : Structure d'un bactériophage (Morgane, 2019).

II. Méthodes d'extraction de l'ADN et réalisation d'antibiogrammes

Le terme de génomique a été créé en 1986 par **T.Roderick** pour décrire la discipline scientifique qui recouvre la cartographie et le séquençage des génomes. Avec le développement des techniques moléculaires, un certain nombre de projets concernant le séquençage complet de différents génomes ont vu le jour.

En février 2001 plus de 800 génomes complets étaient séquencés ou en cours de séquençage. (**Harry, 2001**).

a). Les techniques d'extraction de l'ADN

1. Historique

En 1869, Fredrich Micher utilisa une protéase (la pepsine: qui a été découverte en 1836) pour séparer le noyau du cytoplasme. Il a observé une petite tache de poudre grise qui s'était détachée d'un liquide claire jaunâtre (cytoplasme). Il l'appela nucléine. (**Kamoun, 2003**)

2. L'extraction de la molécule d'ADN

L'extraction de l'ADN chromosomique est réalisée après l'isolement et la mise en culture de la bactérie souhaitée étudier. (Laouar M, 2022).

Les principales étapes pour l'extraction d'un acide nucléique sont : La lyse des cellules et l'élimination des protéines et des lipides.

***Les méthodes d'extraction de l'ADN**

Diverses techniques permettent l'isolement de l'ADN :

2.1. La méthode classique

Les différentes méthodes de l'extraction d'ADN sont des méthodes, dont le principe général reste à peu près le même. La différence entre eux se remarque par rapport aux détails des protocoles ainsi que les produits chimiques rajoutés lors des processus de l'extraction. (Brown, 2010).

2.2. Méthode d'extraction par l'utilisation du phénol et du chloroforme

Les acides nucléiques sont souvent extraits des Bactéries. Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par le chloroforme (non miscible dans l'eau).

(Brown, 2010).

2.3. Méthode saline ou *salting out*

Le principe d'un « *salting out* » repose sur une déshydratation suivie de la précipitation des protéines. L'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension. (Jeannesson, 2007).

2.4. Extraction par colonne échangeuse d'ions

C'est une technique de séparation des acides nucléiques en phase solide, où la solution contenant l'ADN peut être passée à travers une colonne chargée positivement

qui agit comme un filtre en retenant l'ADN (chargé négativement); et en laissant passer les autres constituants. L'ADN reste au final fixé à la colonne puis récupéré. **(Brown, 2010).**

2.5. Les kits commercialisés

Sont des collections qui rassemblent des réactifs et des tampons standardisés prêts à l'emploi, **(Brown, 2010).**

2.6. La méthode automatisée

L'utilisateur sélectionne un protocole à l'aide de l'écran tactile et charge les articles en plastique, les échantillons et les réactifs sur la table de travail QIACube. L'utilisateur lance le protocole, qui fournit toutes les commandes nécessaires pour la lyse et la purification des échantillons à l'aide des colonnes rotatives QIAGEN. **(Douaoudi H, 2019).**

A. La lyse des cellules

La lyse des tissus et des cellules consiste à broyer, puis à extraire l'ADN pour pouvoir dénaturer les protéines (notamment celles reliées à l'ADN dans la chromatine). **(Douaoudi H, 2019).**

B. Lyse mécanique

Permet de casser les cellules procaryotes.

Cette méthode doit être plus draconienne pour les cellules procaryotes (comparées aux cellules eucaryotes). En effet, les bactéries sont cellules de petite taille et peuvent se glisser entre les faisceaux de forces de cisaillement et sont donc parfois très difficiles à lyser mécaniquement... **(Kamoun, 2003).**

C. Lyse chimique

Idéale pour les cellules procaryotes. Leur paroi étant un obstacle majeur à la lyse cellulaire. Cette méthode permet de fragiliser celle-ci ce qui rend la désorganisation de la membrane plasmique efficace. **(Malek, 2013).**

3. L'utilité de l'extraction de la molécule d'ADN

L'ADN extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. La recherche d'un moyen plus efficace d'extraire un ADN de qualité et de rendement supérieurs, a conduit à la mise au point de plusieurs protocoles permettant d'isoler l'ADN de plantes contenant des taux élevés de métabolites secondaires (Carrier, 2011). Les différents protocoles suivent approximativement le même schéma de principe. L'ADN devant dans tous les cas, être conservé dans un tampon TE.

4. Contrôle de pureté de l'ADN extrait

Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminants des préparations absorbent aussi à 260 nm, mais avec un maximum d'absorption qui se situe aux alentours de 280 nm (à cause des acides aminés aromatiques).

Le rapport $R = A_{260nm} / A_{280nm}$ constitue alors un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN par les protéines ou par les ARN. Une contamination par les ARN se traduit par une augmentation du rapport R. Les ARN étant en simple brin. (Harrat C, 2020).

$$R = A_{260nm}/A_{280nm}$$

- ADN pur : $1,8 < R < 2$.
- ADN contaminé par les protéines : $R < 1,7$.
- ADN contaminé par les ARN : $R > 2$.

4.1. Quantification des acides nucléiques

Concentration déterminée par l'absorption à 260 nm solution à 1mg/ml dans une cuve de 1 cm, $A_{260} = 20$. (Aouf, 2015).

5. Electrophorèse des échantillons d'ADN

Objectif : L'électrophorèse est une technique de séparation selon la charge, la taille et la conformation des molécules. (Senicourt, 2016).

L'ADN est une molécule chargée négativement ayant un pH proche de la neutralité, ce qui permet une séparation en fonction de la taille par migration électrophorétique du pôle négatif vers le pôle positif.

b). étude du phénomène de résistance aux antibiotiques

1. Définition des antibiotiques

On appelle antibiotique toute substance chimique, quelle que soit son origine, agissant de manière spécifique sur une étape du métabolisme de bactéries (antibactériennes) ces substances sont d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique. (Delarras, 2014).

2. Les Familles d'antibiotiques

Les antibiotiques sont en général classés selon leur spectre d'activité:

-antibiotiques à large spectre.

-antibiotiques à spectre étroit ou limité. (Delarras, 2014).

3. l'Origine des antibiotiques

Certains antibiotiques sont des substances produites naturellement par certaines moisissures et par certaines bactéries ; ce sont leurs propres armes dans la concurrence vitale qui les oppose à d'autres microorganismes.

Ex : - La streptomycine est produite par *Streptomyces griseus*

-mode d'action des ATB. Ex : Les pénicillines empêchent la synthèse de la paroi bactérienne à Gram positif.

-La zone de diffusion privilégiée dans l'organisme. Ex : Les cyclines ont une bonne diffusion tissulaire

Tableau 02 : Principaux antibiotique classés selon leur site d'action. (Delarasse et *al.*, 2007)

Lieu d'action	Paroi	Membrane	Chromosome	Ribosomes
Antibiotique	Pénicilline Cyclosérine Bacitracine Novobiocine	Thyrothricine Polymyxine	Actionomycine Rifamycine Mitimycine Acide nalidixique	Aminosides Chloramphénicol Tétracycline

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie du département de biologie, université 8 Mai 1945 Guelma.

Les analyses ont été effectuées sur des bactéries isolées à partir du lait de vache cru.

Cette méthode a pour but d'obtenir des acides nucléiques purifiés, l'ADN extrait pourra par la suite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire.

I. Matériel biologique

Le lait cru étudié a été prélevé à partir de vaches de la ferme d'El Fedjoudj. Cette ferme est située près de la vallée Seybouse. Toutes les vaches sont vaccinées et paissent pendant la matinée, elles sont alimentées en foin pendant l'après-midi.

L'abreuvoir dont ce cheptel bovin se sert est constitué d'eau d'irrigation ramenée à l'aide de tonneaux

Les souches bactériennes utilisées au cours de ce travail ont été isolées et conservées sur des milieux de culture spécifiques.



Figure 9 : Les souches bactériennes utilisées.

1. Isolement des souches

Cette technique permettant de séparer les micro-organismes présents dans un même échantillon par l'utilisation de milieux de culture spécifiques et sélectifs vis-à-vis d'un type de bactérie en particulier. (Delarras, 2007).

Les bactéries étudiées sont *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella sp* et *Enterococcus sp* sur les milieux EMB, Chapman, Macconkey et BEA respectivement.

2. Le repiquage des souches

Les milieux de culture utilisés pour le repiquage des souches sont les milieux Chapman, macconkey, EMB et BEA pour les souches d'*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp et *Enterococcus* sp). Ces bactéries ont étéensemencées par épuisement avant d'être incubées à 37°C pendant 18h à 24h.

Le but étant d'obtenir une culture pure et de revivifier les bactéries



Figure 10: Réalisation de l'ensemencement.

3. Mise en culture des bactéries

Après repiquage, l'ensemencement des bactéries par des stries larges sur les milieux spécifiques (HASNI I, 2020). (Tableau 3) selon les espèces des souches obtenues a été réalisé.

Tableau 03: Milieux spécifiques des souches pathogènes étudiées.

Germe	Milieu de culture
<i>E. coli</i> 1 <i>E. coli</i> 2	EMB
<i>Salmonella</i> 1 <i>Salmonella</i> 2 <i>Salmonella</i> 3 <i>Salmonella</i> 4	Macconkey
<i>Enterococcus</i> sp	BEA
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman

4. Identification des bactéries par coloration de Gram

L'identification morphologique des bactéries utilisées a été effectuée par des examens microscopiques après coloration de Gram (**Tableau 4**) (**Menidjel, 2017**). Avant passer à la coloration, un frottis a été préparé en suivant ces étapes :(voir l'Annexe).

4.1. Catalase

Comme son nom l'indique, ce test permet, en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de déterminer si une bactérie est pourvue de l'enzyme catalase ayant pour rôle la décomposition du peroxyde d'hydrogène en H_2O et en O_2 .

La positivité du test est indiquée par la formation instantanée de bulles gazeuses. (**laouar, 2018**).



Figure 12 : les étapes d'une réalisation du test catalase.

4.2. Oxydase

Ce test d'orientation est une étape fondamentale lors de l'identification des bacilles à Gram négatif ayant pour but la détermination de leur type respiratoire par la détection de l'enzyme cytochrome c-oxydase (qui intervient dans la chaîne respiratoire bactérienne en catalysant des réactions d'oxydation). (**laouar, 2018**).

En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet, l'indophénol. (**Camille Delarras, 2006**).



Figure 13 : les étapes d'une réalisation du test Oxydase.

4.3. Réalisation des antibiogrammes

L'antibiogramme est une étape très importante qui permet d'étudier la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques en particulier. (HASNI I, 2020).

La méthode de diffusion classique de disques d'ATB sur gélose Mueller Hinton (MH) qui est un milieu standardisé pour toutes les bactéries sauf quelques souches exigeantes a été appliquée. (Diallo et Kanté, 2019).



Figure 14 : réalisation de l'antibiogramme.

4.4. Conservation des souches

La conservation d'une souche permet de la maintenir en vie le temps de réaliser les tests souhaités réaliser.

La souche 4 de *S.aureus* a été notée résistante à l'érythromycine et à la pénicilline. Elle a donc été mise en contact avec la souche 2 de *S.aureus* dans le but de vérifier s'il y'a transmission de gènes de résistance entre ces souche bactérienne. (HARRAT C, 2020).

5. Test de vérification de la potentielle transmission de gènes entre les bactéries

Au cours de cette expérience, un croisement entre deux souches de *Staphylococcus aureus* est réalisé. L'une étant résistante et l'autre sensible. La bactérie HFR (ayant le facteur F sur son chromosome) possède également un gène de résistance à la pénicilline et à l'érythromycine. La souche F- y étant sensible.

Le protocole complet de ce test :

Etape 1 :

Nous allons effectuer un croisement entre deux souches de *s.aureus*. La bactérie Hfr, ayant le facteur F sur son chromosome. La souche F- .

Prenez 6 tubes et notez-les « Hfr », « F -» et « conjugaison ».

- Mettre 4 ml de milieu LB (à 37°) dans les tubes Hfr et F-.
- Ajouter 300 µl du pré culture Hfr dans le nouveau tube Hfr.
- Ajouter 300 µl du pré culture F- dans le nouveau tube F-.
- Fermer les tubes et mélanger pas inversion.
- Dans le tube « conjugaison », mettre 1 ml de la nouvelle culture Hfr et 1 ml de la nouvelle culture F-.
- Fermer le tube, mélanger par inversion.
- Mettre le tube « conjugaison » à 37° sans agitation et laissez incuber environ 60 minutes. **(Bertrand Emery., 2022).**

Etape 2 :

Pendant ce temps, prenez une boîte de chaque antibiotique (péni/ Eryth et Tet/Str) et une boîte LB.

- Prendre une des boîtes. A l'aide d'un marker, tracer sur le fond de la boîte un cadran de telle sorte.

- Qu'elle soit séparée en trois parties. Noter ces trois parties, Hfr, F- et conjugaison. Faites de même avec les trois autres boîtes.
- Une fois les 60 minutes écoulées : Récupérez votre tube de culture « conjugaison » et vos tubes Hfr et F-.
- Tremper une auge dans la culture Hfr et strier en zigzag la partie correspondante de chaque.
- Boîte antibiotique et de la boîte LB. Faire de même avec les cultures F- et conjugaison.
- Prenez une seconde boîte contenant les deux antibiotiques et déposer 100 µl de la culture.
- « Conjugaison ». Etaler à l'aide d'un râteau. Refermer vos boîtes et les incuber à l'envers à 37° toute la nuit. (**Bertrand Emery., 2022**).

6. Extraction de l'ADN par la méthode de Na Cl

6.1. Méthodes d'extraction de l'ADN génomique

Parmi les méthodes existantes, nous avons choisis cette méthode, en raison de sa rapidité, sa facilité ainsi que l'absence du risque d'intoxication par des produits dangereux tels que le phénol. (**Ghaffour, 2017 ; Bemoussat, 2017**).

6.2. Principe

Le Principe est c'est une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée. Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension.

Le mode opératoire et les solutions tampons utilisés pour l'extraction de l'ADN,

* 3ml de suspension bactérienne ont été transférés dans un tube à essais, avant l'ajout de 3 ml de tampon TE10/10 (Tris/HCL 10mM, EDTA 10mM, pH =8)

* Après une délicate homogénéisation, le tube est mis au frais dans de la glace pendant 30min (le but est de provoquer un choc thermique qui fragilisera la membrane bactérienne. Ainsi, la solution hypotonique de TE provoquera l'éclatement de celles-ci)

*Centrifugation à 2500 tours/mn pendant 15mn, le surnageant est éliminé et le culot obtenu est suspendu dans 6ml de TE. Plusieurs lavages sont effectués.

*Au culot des bactéries sont obtenues, 300µl de solution de lyse (SLB : Tris/Hcl 10mM, EDTA 0.1M, SDS 0.5%, pH=8) sont ajoutés.

*Agitation de ce culot par une Après resuspension rapide

*Une fois le tube retiré du bain-marie, 100µl de solution Na Cl 5M sont ajoutés à celui-ci.

*Après une agitation vigoureuse suivie d'une centrifugation à 4000 tours/mn pendant 15 mn (pour que les deux phases soient séparées),

* Le surnageant résultant est transféré dans un autre tube en évitant de décoller le culot.

*Deux volumes d'éthanol absolu froid de celui du surnageant sont ajoutés dans le tube.

*On remarque que dès l'ajout de l'éthanol, la solution devient blanchâtre et l'ADN commence à se précipiter (l'éthanol condense l'ADN).

*Après une agitation douce, l'ADN se précipite sous forme de filaments qui se compactent rapidement en une masse blanchâtre visible à l'œil nu appelée : *méduse* qui sera ensuite récupérée dans un tube eppendorf stérile, puis lavée à l'éthanol froid à 70% et à 100% et séchée.

*La dissolution de la méduse se fait dans 40 à 100 µl de tampon TE 10/1 (Tris/HCl : 10mM ; EDTA : 1mM ; pH=8.0) selon la taille de la méduse et à une agitation douce à température ambiante pendant au moins 24h pour avoir enfin un ADN complètement dissout prêt à être utilisé (dosage, PCR...).(Berber N., 2020)

-Lavage : l'utilisation de l'éthanol absolu permet d'éliminer les sels. L'ADN est récupéré par centrifugation.

-Séchage: cette étape permet l'élimination totale de l'éthanol.

6.3. Dosage et évaluation de la pureté des échantillons d'ADN obtenus

Le dosage et l'évaluation de la pureté de nos échantillons d'ADN sont effectués par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie.

- **Mode opératoire :**

A l'ADN précipité et séché sont ajoutés 1,5 ml de TE 10/10 mM pour le redissoudre.

La lecture est effectuée de la manière suivante :

- Une première lecture à une longueur d'onde de 260 nm permet d'estimer la densité optique des acides nucléiques.
- Une seconde lecture est effectuée à une longueur d'onde de 280 nm afin d'estimer la densité optique des protéines.



Figure 16 : spectrophotomètre.

7. Détermination de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité

7.1. Détermination de la concentration de l'ADN

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en U.V à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN ou de l'ARN.

La concentration de l'ADN extrait a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm sachant que: 1 unité de DO260 nm = 50 µg/ ml d'ADN.

On mesure donc à 260 nm la DO d'une dilution au 1 /250ième de la solution mère. **(Brodeur et Toussaint, 2015).**

On déduit la concentration de l'ADN grâce au calcul suivant :

[ADN] (µg / ml) = Facteur de dilution x DO 260 nm x 50 µg / ml

7.2. Pureté de l'ADN

L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique **(Denis et al., 2018).**

Tableau 05: les valeurs acceptables du ratio (260/280) pour un ADN pur [7]

Ratio	Valeur	Indication de pureté
260/280	1,8	ADN pur
	< 1,8	Présence de protéines, phénol et autres Contaminants
	> 1,8	Contamination ARN
260/280	1,8 - 2,2	ADN pur
	< 1,8	Contaminants Co-purifiés (solvants, sels, contaminants organiques

Les valeurs minimales acceptables du ratio sont : 260/280 ≥ 1,8 et 260/230 ≥ 1,6

Résultats et Discussion

1. Culture des bactéries

Les résultats de l'identification des souches bactériennes étudiées sont présentés dans le (tableau 06).

2. Résultats des antibiogrammes

Les résultats des différents antibiogrammes effectués pour les souches *S.aureus*, *Salmonella* sp et *E. coli* sont résumés dans le tableau ci-dessous (tableau 07).

Tableau 06 : Les résultats d'antibiogramme.

Nom des bactéries	Antibiotique	Antibiogramme
<i>Staphylocoques aureus</i>	*Pénicilline (S) *Gentamicine (S) *Erythromycin (S) *chloramphénicol (S)	
	*Pénicilline (S) *Gentamicine (S) *Erythromycin (S) *chloramphénicol (S)	
	*Pénicilline (S) *Gentamicine (S) *Erythromycin (S) * chloramphénicol (S)	
	*Pénicilline (R) *Gentamicine (S) *Erythromycin (R) * chloramphénicol (S)	

<i>Salmonella</i>	*Gentamicine (S) *chloramphénicol (S)	
		
		
		
<i>E. coli</i>	*Gentamicine (S) *chloramphénicol (S)	
		

3. Résultats des tests d'orientation

Les résultats de la coloration de Gram, du test de la catalase et de l'oxydase sont résumés dans le (tableau 07).

Tableau 07: résultats de la coloration de Gram, du test de la catalase et de l'oxydase.

Bactéries \ tests	Catalase	Oxydase	coloration de Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	Négative	Cocci Gram positif
<i>Salmonellasp</i>	Négative	Négative	Bacille Gram négatif
<i>E. coli</i>	Négative	Négative	Bacille Gram négatif
<i>Enterococcusp</i>	Négative	Souche 1 : Positive Souche 2 : Négative	Cocci Gram positif

4. Résultats du test de la transmission des gènes de résistance

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant et la Figure.

Tableau 08 : Résultats de la transmission de gènes de résistance entre les espèces.

Mode de transfère \ ATB	HFR	Conjugaison
Pénicilline	la bactérie (<i>S. aureus 4</i>) résistante	les bactéries (<i>S. aureus 4</i> et <i>S. aureus 2</i>) résistantes
Erythromycine	la bactérie (<i>S. aureus 4</i>) résistante	les bactéries (<i>S. aureus 4</i> et <i>S. aureus 2</i>) sensibles

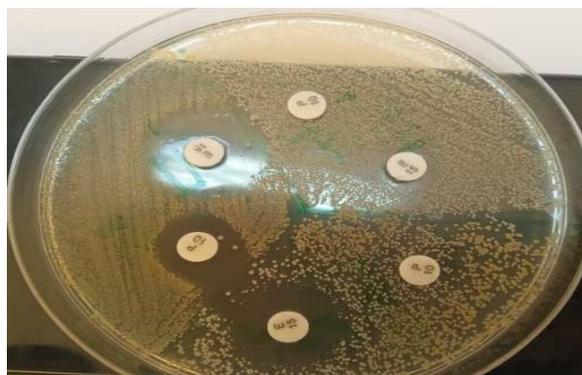


Figure 17: test de transfert des gènes.

5. Résultats de l'extraction de l'ADN Chromosomique

L'ADN est visible à l'œil nu, sous forme de filaments formant une méduse (Figure18).



Figure 18: Résultat de la précipitation de l'ADN après extraction.

6. Evaluation du degré de pureté des échantillons d'ADN obtenus et Dosage

La pureté de l'ADN est estimée par dosage au spectrophotomètre. Les mesures des DO à deux longueurs d'ondes ainsi que les ratios.

Le calcul du rapport DO (260nm)/DO (280nm) montre que 8 échantillons d'ADN sur les 14 étudiés, sont contaminés par les protéines et ARN.

Les densités optiques et le rapport obtenus pour chaque échantillon d'ADN sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 09 : Les densités et rapport de l'évaluation de la pureté des échantillons d'ADN

Les échantillons	DO (260 nm)	DO (280 nm)	DO (260nm)/DO(280nm)
<i>Enterococcus</i> sp1	0,156	0,097	1,6
<i>Enterococcus</i> sp2	0,085	0,048	1,7
<i>E. Coli</i> 2	0,069	0,045	1,5
<i>E. Coli</i>	0,165	0,108	1,5
<i>Salmonella</i> 3	0,041	0,021	1,9
<i>Salmonella</i> 4	0,059	0,078	0,8
<i>S. aureus</i> 2	0,143	0,065	2,2
<i>S. aureus</i> 4	0,099	0,049	2

Les densités optiques obtenues à la longueur d'onde de 260 nm montrent des différences très importantes, alors que le volume de la suspension bactérienne est le même pour chaque tube.

Les échantillons *Salmonella 3* et *S. aureus 4* ont un degré de pureté de (1,7) et (1,9) ce qui signifie que l'ADN chromosomique obtenu est pure (1,8). et les échantillons

S. aureus 4 au degré de pureté (acceptable).

les échantillons *Enterococcus 1*, *Enterococcus 2*, *E. coli 2*, *E. coli 3* et *Salmonella 4*, ont des degrés de pureté de 1,6, 1,7, 1,5, 1,5 et 0,8 respectivement ce qui prouve que les échantillons sont contaminés par des protéines : ceci est dû à la non-utilisation de protéinase K comme indiqué dans le protocole.

Ces valeurs prouvent que l'échantillon d'ADN est contaminé par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques.

(Alexander, 2016).

Les échantillons *S. aureus 2* et au degré de pureté de 2,2 ce qui indique une contamination par des ARN.

**La concentration en ADN a été évaluée par la densité optique mesurée à 260 nm, en se basant sur la formule : Pour une DO de 1 la concentration est de 50 µg/ml

Exemple : On a pour:

$$\text{DO} = 1 \longrightarrow 50 \mu\text{g/ml}$$

$$0,156 \longrightarrow X$$

$$X = (0,156 \times 50) / 1 \longrightarrow x = 7,8 \mu\text{g/ml}$$

Tableau 10 : Dosage de l'ADN dans les échantillons

Les échantillons	DO (260 nm)	Concentration en ADN (µg/ml)
<i>Enterococcus</i> 1	0,156	7,8
<i>Enterococcus</i> 2	0,085	4,25
<i>E. Coli</i> 2	0,069	3,45
<i>E. Coli</i>	0,165	8,25
<i>Salmonella</i> 3	0,041	2,05
<i>Salmonella</i> 4	0,059	2,95
<i>S. aureus</i> 2	0,143	7,15
<i>S. aureus</i> 4	0,099	4,95

Certains auteurs pensent que l'hydratation et la précipitation des polypeptides par une solution saturée en sel (Miller 1988, Dykes 1988, Laitinen et al., 1994) donne un ADN de mauvaise qualité (Bourgoin et al. 1997).

Aussi, Selon Comey et ses coauteurs (1994), la méthode organique (au phénol chloroforme) s'avère donner des rendements en ADN supérieurs en plus d'être la plus sûre pour obtenir de l'ADN génomique.

7. Test de vérification de la potentielle transmission de gènes entre les bactéries

Avant la réalisation du test, la souche *S.aureus* 2 était sensible à la pénicilline et à l'érythromycine. Après conjugaison des souches Hfr et F-, cette même souche a été notée résistante à la pénicilline. Tandis que le diamètre d'inhibition vis-à-vis de l'érythromycine a diminué faisant passer la bactérie de résistante à intermédiaire.

Il est possible de déduire qu'il y'a eu transmission du gène de résistance vis-à-vis de la pénicilline ce qui montre la résistance est porté par l'ADN plasmidique.

La diminution du diamètre d'inhibition à l'érythromycine peut être expliquée par une mutation produite par la bactérie entre deux générations :

Les plus récentes avancées en terme de recherche ont également montré que les bactéries sont capables de répondre aux stress créés par les antibiotiques (lors d'un traitement) en réorganisant certains gènes de résistance au sein de leur génome pour favoriser la résistance aux antibiotiques (plasticité génétique) (**Baharoglu et al, 2010** ;**Hocquet et al, 2012**). [8]

Conclusion

Conclusion

Les techniques d'extraction d'acides nucléiques sont relativement simples. Dans ce travail, l'extraction de l'ADN génomique bactérien issues de lait de vache cru a été réalisée par la méthode Na Cl. La réalisation d'antibiogrammes et de tests permettant la vérification de la transmission des gènes de résistance entre les bactéries a permis de mettre l'accent sur le phénomène de résistances et de mutations chez les bactéries.

La méthode d'extraction par Na Cl a permis d'obtenir des échantillons deux échantillons purs, cinq échantillons contaminés par des protéines et deux contaminés par des ARN.

Le test de transmission de gène sa permis de déduire la transmission du gène de résistance à la pénicilline via le phénomène de conjugaison, ce qui prouve que le gène est porté par l'ADN plasmidique et non chromosomique. La diminution du diamètre d'inhibition pour l'érythromycine indique une mutation produite par la bactérie dans le but de s'adapter à la présence de cette molécule, ce qui peut être un réel problème dans le temps.

Pour conclure, la méthode d'extraction de l'ADN génomique reste sans danger (comparée à la méthode utilisant le phénol et le chloroforme) mais celle-ci n'est pas assez performante car l'ADN reste contaminé par les protéines et les quantités extraites restent faibles.

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement l'extraction et la purification à l'aide de réactifs prêts à l'emploi. Cet instrument peut accueillir plusieurs échantillons simultanément en un temps très court.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques :

A

Aouf A, 2015. Livre de Biologie Moléculaire et Génie Génétique, Université Ferhat Abbas-Sétif 1, pp96-100.

Avery Ot, McLeod CM, McCarthy M, 1994. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III. Journal of Experimental Medicine, 79, pp. 137-158.

B

Brown T, 2010. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction 6th edition. Ed, John Wiley and Sons. USA.

Bourgoin S, Bergeron J, Sarafian V, Jolicoeur C, d'Auteuil M.L, Linard C, Mailly F, 1997. Extraction d'ADN et amplification de sites STR sur des échantillons de type judiciaire. Présenté au 65^e Congrès de l'ACFAS, Université du Québec Trois-Rivières

Bertrand Emery, 2022. Expérience De La conjugaison. Enseignant au Collège Calvin.

(Berber N, 2020). Protocole d'extraction NACL et préparation des solutions.

C

Camille Delarras, 2006 « Pratique en microbiologie de laboratoire » Recherche de bactéries et de levures-moisissures Edition : Céline Poiteaux. p757.

Carrier G, 2011. Bases moléculaires de la variation clonale chez la vigne (*Vitis vinifera* L.): approche pangénomique. Thèse de doctorat, Montpellier, SupAgro, 127p.

D

Dublanchet A, 2017. La phagothérapie: des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques.

Delarras C, 1981 Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Aliments. Produits pharmaceutiques. Paris, éditions Lavoisier.

Diallo Y, Kanté S, 2019. Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent (Master en biologie moléculaire et cellulaire). 8 MAI 1945, Guelma.

DOUAOUDI H, 2019. Extraction de l'ADN à partir de sang de mouton. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. Master Génétique FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE.

F

Francis et Taylor, UK , 2013. L'ESSENTIEL EN Biologie Moléculaire. Edition. INTERNATIONALE, d'origine « BIOS instant notes in Moléculaire Biologie » pp373.

J

Jeannesson E, 2007. «Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires», Thèse de Doctorat de université de Lorraine «université Henri Poincare – Nancy », pp 27-39.

H

Hamzeh Z, 2014. Étude sur l'utilisation de cocktail de bactériophages pour l'élaboration de surfaces antibactériennes (masters). Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières.

Harry M, 2001. « Génétique Moléculaire et évolutive » collection Sciences fondamentales, université paris XII-Vall de Marne édition Maloine pp 323.

HASNI I., 2020. Recherche et isolement des bactériophages et leur application sur les bactéries résistantes aux antibiotiques. Université Guelma 08 mai 1945. Diplôme de Master Biologie Moléculaire et Cellulaire.2020.

HARATH C, 2020. Extraction d'ADN à partir de sang humain par trois méthodes différentes. Université Guelma 08 mai 1945. Diplôme de Master Biologie Moléculaire et Cellulaire.

G

Griffith A, Gelbart W, Miller J et Lewontin R, 2001. Analyse Génétique Moderne. De Boeck, Paris, France, pp329.

Ghaffour Amina 2017. Contribution à la construction d'une bioéthique d'ADN de patients et résistants à la brucellose et conception des amorces du gène TNF alpha, mémoire de master d'université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, pp44.

K

Kamoun, 2003. « Biochimie et biologie moléculaire », Médecine-Sciences Flammarion, pp122-130.

Khorana HG 1961. Some recent developments in the chemistry of phosphate esters of biological interest. Wiley, New York.

Karp G 2004. « Biologie cellulaire et moléculaire », 2ème édition, Paris, P 79.

L

Laouar M, 2018 Essais de biodégradation du pesticide Abamectine par *Pseudomonas putida*. Université Badji Mokhtar-Annaba. Diplôme de Master Microbiologie appliquée. 2018.

M

Malek F, 2013. Le biofilm en industrie laitière : caractérisation facteurs de développement et élimination, thèse de doctorat de Tlemcen.

Morgane A, 2019. Intérêt de la phagothérapie dans le traitement et la prévention des maladies du tube digestif (phdthesis). Université de Lille, France.

Menidjel N, 2017. Les infections nosocomiales à bactéries multi-résistantes (Master en biologie moléculaire des procaryotes). SNV. STU, Guelma.

Miller S.A, 1988. a simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.

N

Nirenberg MW, Matthaei JH (1961), the dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, pp. 1588-602.

R

Roseline L, Benoit L, Projetbleu, 2008 « Immunologie », Immuno-hématologie, pp7

Ronald w, Dudek, 2002. « Biologie cellulaire et moléculaire » ~éditions Pradel, département of Anatomie and Cell Biologie, pp 13.

S

Senicourt L, 2016. Études des protéines membranaires TSPO, Thèse de doctorant université Pierre et Marie Curie, pp 86-134.

T

Turner PC, A.G McClennan., A.D Bates & M.R.H White .l'essentiel en biologie moléculaire .école de sciences biologiques. University of Liver-pool, Liverpool, UK. ISBN: 2- 911808-10-X, p 38-51.

Tan S. C.and Yiap B. C. 2009. “DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009: 7-10.

Y

Ye, M., Sun, M, Huang D, Zhang Z., Zhang H., Zhang S, Hu, F., Jiang X., Jiao, W., 2019. A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environ. Int.* 129, 488–496.

Site web:

- [1] <https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55899&demande=desc> consulté le 01 Juin 2022
- [2] <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-adn-87/> consulté le 25 Mai 2022
- [3] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:R%C3%A9plicationdelADN.png> consulté le 07 Juin 2022
- [4] <https://www.schoolmouv.fr/cours/les-mutations-de-l-adn-et-la-variabilite-genetique/fiche-de-cours> consulté le 07 Juin 2022
- [5] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Plasmide> consulté le 03 Juin 2022
- [6] <https://www.aquaportail.com/definition-14795-cellule-bacterienne.html> consulté le 07 Juin 2022
- [7] <https://cit.ligue-cancer.net/bioresources/index.php/la-qualification/la-purete-de-lechantillon/> consulté le 26 Mars 2020
- [8] https://www.researchgate.net/figure/Comment-diffusent-les-genes-de-resistance-aux-antibiotiques_fig3_341754016

ANNEXE

ANNEXE

Annexe I : Extraction de l'ADN par la technique Na Cl

***Matériels, réactifs et appareils utilisés**

- Matériels: Seringues de 5 ml stériles, Gants, Tubes flacon, Eppendorfs, Embouts, Pipettes Pasteur, Pissettes, Béchers, éprouvettes, Portoirs, Micropipettes.

- Réactifs: EDTA, Tris, Na OH, H Cl, SDS, Na Cl, Protéinase K, Ethanol 70%.

- Appareils: Appareil à glace, Centrifugeuse, Bain marie. **(HARATH C., 2020).**

Annexe II : Identification des bactéries par coloration de Gram

Avant passer à la coloration, un frottis a été préparé en suivant ces étapes :

- *Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame propre.
- * Faire étaler avec une anse de platine ou une pipette pasteur une colonie bactérienne sur la goutte d'eau de façon circulaire.
- *Réaliser le frottis par un doux étalement.
- * Sécher et fixer le frottis devant un bec bunsen. (Menidjel, 2017).

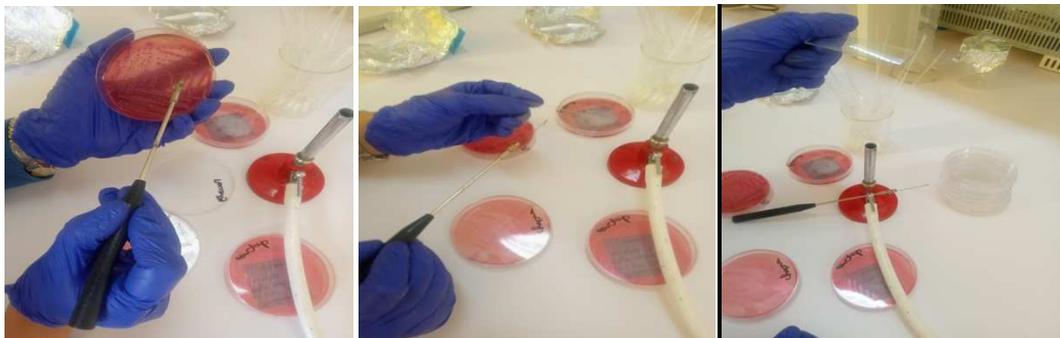


Figure 11: les différentes étapes de la réalisation d'un frotti.

Tableau 04: L'examen de coloration de Gram et son but.

Type d'examen	Méthode de l'examen	But de l'examen
Examen direct à la coloration de Gram	<ul style="list-style-type: none"> * Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane pendant une minute. * Rincer avec l'eau de robinet * Recouvrir la lame avec du lugol pendant une minute. * Rincer à l'eau de robinet. * Verser l'alcool sur le frottis jusqu'à l'élimination du couleur. * Rincer à l'eau de robinet. * Ajouter la Fuschine pendant une minute * Rincer à l'eau de robinet * Laisser sécher la lame * Observer au microscope optique à l'objectif x 100 à l'aide d'huile à immersion de cèdre. 	<p>Permet d'identifier 02 types de germes :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Gram positif de couleur violet foncé. ✓ Gram négatif de couleur rose. <p>Permet d'identifier la morphologie des germes : Cocci - Bacille - Coccobacille et leur mode de groupement.</p>

Annexe III : Les solutions et tampons utilisés lors de l'extraction de l'ADN :***La solution de TE 10/10 :**

Eau distillée	242,5ml
Tris-HCL	2,5ml
EDTA	5g

***La solution de TE 10/1 :**

Eau distillée	250ml
Tris-HCL	2,5ml
EDTA	0,5g

***La solution de lyse (100ml) :**

Eau distillée	74ml
Tris-HCL	1ml
EDTA	20g
SDS	5ml

**Figure 15 :** Ajustement du Ph par HCL

***La solution de Na Cl :**

Eau distillée 250ml

Na Cl 73,06g

***La solution d'EDTA :**

Eau distillée 250ml

EDTA 58,16g

Ajustez le pH à 8 en ajoutant du Na OH concentré

***La solution TRIS-HCL :**

Eau distillée 250ml

TRIS 12,11g

Ajustez le pH à 8 en ajoutant du HCl concentré.

***Solution de SDS à 0,5%**

SDS 0,0015 g

Eau distillée 3 ml

Milieu LB (LuriaBertani) 500ml :

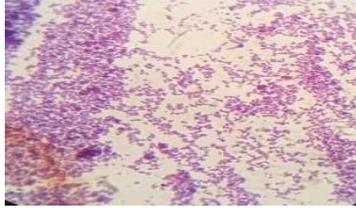
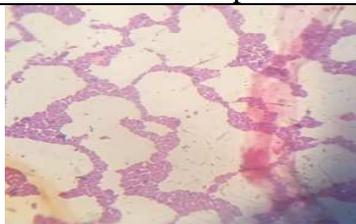
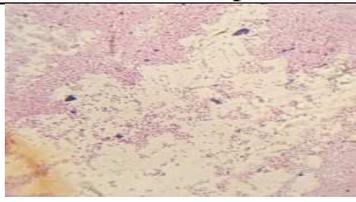
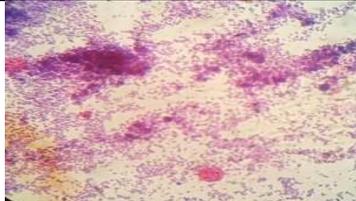
Na Cl 5g

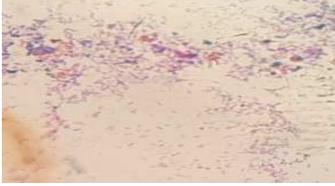
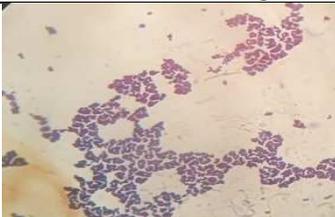
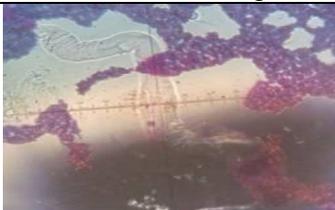
Tryptone 5g

Extrait de levure 2,5g

Eau distillée 487,5ml

Annexe IV : Résultats de la coloration de Gram,

Nom des bactéries		Aspect microscopique
Staphylococcus aureus	Souche1	 Cocci à Gram positif
	Souche2	 Cocci à Gram positif
	Souche3	 Cocci à Gram positif
	Souche4	 Cocci à Gram positif
<i>Salmonella</i>	Souche1	 Bacille à Gram négatif
	Souche2	 Bacille à Gram négatif
	Souche3	 Bacille à Gram négatif

	Souche4	 <p>Bacille à Gram négatif</p>
<i>E. coli</i>	Souche1	 <p>Bacille à Gram négatif</p>
	Souche2	 <p>Bacille à Gram négatif</p>
<i>Enterococcus</i>	Souche1	 <p>Cocci à Gram négatif</p>
	Souche2	 <p>cocci à Gram positif</p>

Glossaire

Adénine : une base de type purique qui s'apparie avec la thymine dans la double hélice d'ADN

ADN (acide désoxyribonucléique) : long polymère non ramifié composé de 4 types de nucléotides à désoxyribose, unis par des liaisons phosphodiester ; l'ADN est le dépositaire de l'information génétique. A l'état naturel, la molécule d'ADN est une hélice double formée de deux brins antiparallèles.

ARN (acide ribonucléique) : long polymère non ramifié, monocaténaire, composé de nucléotides ribosidique unis par des liaisons phosphodiester ; il est issu de la transcription d'un ADN et, chez certains virus, par copie d'un ARN. Les trois types d'ARN cellulaire ARNm, ARNt, ARNr jouent chacun un rôle propre dans la synthèse des protéines.

ARNase (ribonucléase) : enzyme qui découpe un brin d'ARN, éventuellement jusqu'à hydrolyse complète, en donnant des ribonucléotides.

Centrifugation : application de forces centrifuges élevées à la préparation ou la séparation de molécules, particules ou cellules en solution/suspension, basée sur une différence de masse, de forme ou de densité.

Double hélice : la structure de l'ADN, proposée pour la première fois par Watson et Crick, constituée de deux hélice entrelacées liées par des liaisons hydrogène entre les bases appariées.

Eucaryote : un organisme qui possède des cellules eucaryote. **Liaison phosphodiester** : une liaison entre un groupement sucré et un groupement phosphate ; ce type de liaison se forme dans le squelette sucre-phosphate de l'ADN.

Nucléotide : une molécule composée d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate. L'unité élémentaire de construction des acides nucléiques.

PH : échelle d'acidité ou de basicité d'une solution ; c'est le cologarithme de la concentration d'ions H⁺ exprimée en mol / litre ; une solution de pH=7 est neutre, en dessous, elle est acide, au-dessus, elle est basique.

Purine : composé basique à deux noyaux hétérocycliques fusionnés présent dans les acides nucléiques. Les purines habituellement présentes dans l'ADN et l'ARN sont l'adénine et la guanine.

Pyrimidine : composé basique à un noyau hétérocyclique fusionné présent dans les acides nucléiques. Les pyrimidine courantes de l'ADN sont la cytosine et la thymine ; dans l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile.

Tampon : mélange des formes acide (HA) et basique (A-) d'une substance chimique choisie pour que le pH de la solution se modifie à peine quand on y'ajoute une petite quantité d'acide fort ou de base forte.

Thymine : une base pyrimidique qui s'apparie avec l'Adénine.