

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Thème :

**Extraction De L'ADN Plasmidique De Bactéries Pathogènes Isolées À
Partir De Lait De Vache Cru**

Présenté par :

- Yahiaoui Rayane.
- Saaidia Nihal.
- Haddad Yousra.
- Atailia Asma.

Devant les jurys composés de :

Président :	Benouareth.Djamel	Pr.	Université de Guelma
Examinatrice :	Abdaoui. Wissam	M.C.B	Université de Guelma
Encadrante :	Souiki.Lynda	Pr.	Université de Guelma
Co-Encadrante :	Laouar. Meriem	Doctorante	Université d'Annaba

Juin 2022

Remerciements

Nous remercions ALLAH tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénie pour la réalisation de ce travail.

*Nous tenons particulièrement à remercier notre directrice de mémoire mademoiselle « **LAOUAR Meriem** » et Madame « **SOUIKI Lynda** » pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, son encouragement et ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que sa confiance au long de cette étude.*

Nous adressons aussi ma gratitude aux membres de jury monsieur

*« **Benouareth.DJ** » et*

*Mme « **Abdaoui.W** » qui nous fait l'honneur d'évaluer ce modeste travail. Nous*

Tenons à remercier aussi tous nos enseignants qui ont participé à notre

Formation tout au long de notre cursus...

Dédicaces

Ce projet de fin d'études dédié à

*Mes chers parents « **Samia et Mohamed Lakhdar** », pour tous leurs sacrifices,
leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes
études,*

*A mon mari « **Mohamed Amine** », pour ses encouragements merci d'être toujours
là pour moi.*

*A ma chère sœur « **Rania** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien
moral,*

*A mes chers frères, « **Saif, Chakir et Ismail** », pour leur appui et leur
encouragement,*

*A ma grand-mère « **Houria** », mes tante « **Nissa et Naima** » et toute « **ma famille**
» et « **ma belle-famille** » pour leur soutien tout au long de mon parcours
universitaire,*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de
votre soutien infailible,*

*Sans oublier mes collègues « **Nihal, Yusra et Asma** » pour notre amitié notre
patience et la compréhension tout au long de ce projet.*

*A mes amis les plus proches « **Yusra B et Asma c** » pour leur aide et le support
dans les moments difficiles je t'aime de mon cœur.*

*« **Rayane** »*

Dédicaces

Ce projet de fin d'études dédié à

*Mes chers parents « Sabrina et Kamel », pour tous leurs sacrifices, leur amour,
Leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*A mon mari « Houssam », pour ses encouragements merci d'être toujours là pour
moi.*

A mes chère sœurs « Meriem el Batoul et Rihab el Djana » pour leurs

Encouragements permanents, et leur soutien moral,

A ma chers frère, « Siradj el Din »,

A ma poupée ma fleur « Sidra »,

A mes tantes et toute « ma famille » et « ma belle-famille » pour leur soutien tout

Au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de

Votre soutien infailible,

Sans oublier mes collègues « Rayane, Yusra et Asma » pour notre amitié notre

Patience et la compréhension tout au long de ce projet.

« Nihal »

Dédicaces

Ce projet de fin d'études dédié à

*Mes chers parents « **Nadia et Khemissi** », pour tous leurs sacrifices, leur amour,
leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*A mon mari « **Chawki** », pour ses encouragements merci d'être toujours là pour
moi.*

*A mes chères sœurs « **Ilham et Ghâdâ** » pour leurs encouragements permanents, et
leur soutien moral,*

*A mon cher frère, « **Mohamed lamine** », pour leur appui et leur encouragement,*

*A ma grand-mère « **fatma Zohra** », mes tantes « **Soraya et Warda** » et toute « ma
famille » et « ma belle-famille » pour leurs soutien tout au long de mon parcours
universitaire, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et
le fruit de votre soutien infailible,*

*Sans oublier mes collègues « **Nihal, Youssra et Rayane** » pour notre amitié notre
patience et la compréhension tout au long de ce projet.*

*A mon amie la plus proches « **Salma** » pour leur aide et le support dans les
moments difficiles je t'aime de mon cœur.*

*« **Asma** »*

Dédicaces

Ce projet de fin d'études dédié à

*Mes chers parents « **fahima et farid** », pour tous leurs sacrifices, leur amour,*

Leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

*A mes chers frères, « **Ishak, Mohamed et yaakoub** », pour leur appui et leur*

Encouragement,

*A mes grand-mère « **Houria** », et « **khroufa** » reposez en paix et mes grands*

*Pères « **mahmod et Mohamad** » et toute « **ma famille** » Et mon petit chat*

Milka pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

*Sans oublier mes collègues « **Rayane, Nihal et Asma** » pour notre amitié notre*

patience et la compréhension tout au long de ce projet.

*A mes amis les plus proches « **Sara, Rayane et Lobna** » Pour*

Leur aide et le support dans les moments difficiles je t'aime de mon cœur.

*« **Yousra** »*

Résumé

L'ADN bactérien (qu'il soit plasmidique ou chromosomique) peut renfermer des gènes de résistance aux antibiotiques et porter des facteurs de virulence transmissibles soit de manière horizontale ou verticale à d'autres cellules bactériennes. Le but de ce travail fut principalement l'extraction de l'ADN plasmidique bactérien à partir de bactéries isolées de liquides biologiques divers (lait de vache cru, pu, urine) par la méthode de la lyse alcaline qui est une méthode simple et facile ne nécessite pas l'utilisation de produits toxiques (tels que le phénol et le chloroforme). La réalisation d'antibiogrammes sur les espèces (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* et *Escherichia coli*) en présence de (pénicilline G, érythromycine, chloramphénicol et gentamicine) et de tests permettant la vérification de transferts des gènes après mises en culture la souche résistante et la souche sensible avec la présence des antibiotiques. Les méthodes d'extraction d'ADN doivent être validées afin de générer un ADN pur de bonne qualité. À la fin, le critère a été évalué, le degré de pureté d'ADN.

Mots clés : Extraction de l'ADN plasmidique, bactéries pathogènes, lyse alcaline, antibiogrammes, antibiotiques, conjugaison.

Abstract

Bacterial DNA (whether plasmid or chromosomal) can contain antibiotic resistance genes and carry virulence factors that can be transmitted either horizontally or vertically to other bacterial cells.

The aim of this work was mainly the extraction of bacterial plasmid DNA from bacteria isolated from various biological fluids (raw cow's milk, pu, urine) by the alkaline lysis method which is a simple and easy method that does not require the use of toxic products (such as phenol and chloroform). The realization of antibiograms on species (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* and *Escherichia coli*) in the presence of (penicillin G, erythromycin, chloramphenicol and gentamicin) and tests allowing the verification of gene transfers after putting in culture the resistant strain and the sensitive strain with the presence of antibiotics The DNA extraction methods must be validated in order to generate pure DNA of good quality. At the end, the criterion was evaluated, the degree of DNA purity.

Keywords: Plasmid DNA extraction, pathogenic bacteria, alkaline lysis, antibiograms, antibiotics, conjugation.

المخلص

يمكن أن يحتوي الحمض النووي البكتيري (سواء كان بلازميدًا أو كروموسومياً) على جينات مقاومة للمضادات الحيوية ويحمل عوامل ضراوة يمكن أن تنتقل إما أفقياً أو عمودياً إلى خلايا بكتيرية أخرى.

كان الهدف من هذا العمل بشكل أساسي هو استخراج DNA البلازميد البكتيري من البكتيريا المعزولة من السوائل البيولوجية المختلفة (حليب البقر الخام ، البولي يوريثان ، البول) بطريقة التحلل القلوي وهي طريقة بسيطة وسهلة. لا تتطلب استخدام المواد السامة. المنتجات (مثل الفينول والكلوروفورم). أداء المضادات الحيوية على الأنواع (*Staphylococcus aureus*) و *Salmonella sp* و (*Escherichia coli*) في وجود البنسلين G ، والإريثروميسين ، والكلورامفينيكول ، والجنتاميسين (واختبارات تسمح بالتحقق من نقل الجينات بعد استنبات السلالة المقاومة والسلالة المعرضة لها. وجود المضادات الحيوية. يجب التحقق من صحة طرق استخراج الحمض النووي من أجل إنتاج حمض نووي نقي عالي الجودة. في النهاية ، تم تقييم المعيار ، ودرجة نقاء الحمض النووي.

الكلمات المفتاحية: استخراج DNA البلازميد ، البكتيريا المسببة للأمراض ، التحلل القلوي ، المضادات الحيوية ، المضادات الحيوية ، الاقتران.

Sommaire

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
I. Définition	2
II. Composition bactérienne	2
1. Le chromosome bactérien	2
2. Les éléments transposables	3
III. Les bactéries pathogènes.....	8
IV. Les bactéries opportunistes	8
V. Caractéristiques des souches bactériennes.....	8
VI. Les mutations	12
1. Caractères des mutations	12
2. Mécanisme de mutations	13
3. Substitutions	13
4. Types de mutations génétiques	13
VII. Mécanisme de réparation	14
1. Réparation de la cassure double brin.....	14
2. Réparation de cassures simple brin	15
VIII. Le transfert des gènes	15
1. Le transfert vertical	15
2. Les transferts horizontaux des gènes.....	16
1) La transformation	16
2) La conjugaison	18

3) La transduction	20
IX. Mode d'action des antibiotiques	22
1. Définition des antibiotiques	22
2. Mécanisme d'action des antibiotiques	22
3. Résistance bactérienne aux antibiotiques	23
1. Objectif de l'étude.....	24
2. Matériel biologique.....	24
3. Repiquage des souches	24
4. Protocole de conjugaison entre deux souches bactériennes.....	25
5. Extraction de l'AND plasmidique	26
6. Dosage par spectrophotométrie.....	28
Résultats et discussion.....	2
1. Résultats relatifs aux analyses microbiologiques :.....	30
2. Résultats relatifs aux analyses de biologie moléculaire :.....	37
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	41

Liste des abréviations

R : résistance

S : sensible

ATB : antibiotique Facteur

Inc : groupe d'incompatibilité

F : facteur de fertilité

R : facteur de résistance

Facteur col : facteur de colicinogène

Tns : transposon

Int : intégrons

IS : séquence d'insertion

RC : *rolling cercle*

Ori : origine de réplication

PLP : protéine de liaisons de pénicilline

MLS : macrolides, lincosamides, streptogramines

Hfr : haute fréquence de recombinaison

SDS : sodium de dodécyl sulfate

TE : tris-EDTA

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

pB : Paires de bases

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Les différents composants d'une cellule bactérienne.	3
2	La structure du plasmide R.	6
3	La structure du plasmide F	6
4	Transfert de gènes vertical des bactéries au cours de la fission binaire.	16
5	Transformation bactérienne, (a) fixation de l'ADN nu, (b) intégration du fragment d'ADN après recombinaison homologue.	18
6	Technique de transformation artificielle d'une bactérie sensible à un antibiotique par le traitement de cacl ₂ .	19
7	Comparaison entre la conjugaison chez les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.	20
8	Mécanisme de conjugaison Hfr entre deux bactéries.	21
9	Structure générale d'un bactériophage.	22
10	Mécanisme de résistance chez les bactéries liées aux modes d'action des antibiotiques (ATB).	23
11	Les différentes souches bactériennes utilisées.	26
12	Repiquage des souches bactériennes avec un ensemencement par épuisement sous forme des stries.	27
13	Les différentes étapes du test de transfert entre les bactéries (conjugaison).	28
14	Les différentes étapes de l'extraction d'ADN plasmidique.	28
15	Appareillage de spectrophotométrie.	29
16	Résultat de transfert par conjugaison des gènes de résistance entre S4 et S2.	37
17	Résultats du transfert par conjugaison des gènes de résistance entre S4 et S3.	37
18	Obtention de l'ADN plasmidique.	39

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
01	Résultats du test de la catalase et de l'oxydase des différentes souches bactériennes étudiées (<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp).	31
02	Résultats du test de coloration de Gram pour les souches de (<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i>).	32
03	Résultats des antibiogrammes effectués pour les souches <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp et <i>Staphylococcus aureus</i> en présence de gentamicine, de chloramphénicol, d'érythromycine, et de pénicilline.	33
04	Les valeurs d'absorbance de l'ADN plasmidique extrait dans l'eau distillée stérile.	39

Introduction

Introduction

L'ADN est le support génétique qui renferme toutes les informations de la cellule chez les organismes vivants. Grâce à la biologie moléculaire, il est possible de décoder les mystères du vivant tel que le phénomène de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes.

La résistance bactérienne aux antibiotiques a été reconnue par l'organisation mondiale de la Santé comme l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale à cause de leur capacité de transférer à partir de l'échange du matériel génétique verticalement ou horizontalement entre les bactéries, la sécurité alimentaire et le développement et sa propagation pourrait changer la médecine dans les prochaines années. **(GPBP, 2017)**

Cette résistance aux antibiotiques est codée par des gènes qui peuvent être portés, soit sur le chromosome bactérien, soit sur des éléments extrachromosomiques (les plasmides), ces gènes peuvent aussi se transposer, et s'échanger entre les différents réplicons sur le chromosome et les plasmides.

Le principal objectif de ce travail est l'extraction de l'ADN plasmidique à partir de bactéries pathogènes isolées à partir du lait de vache cru en utilisant la méthode de la lyse alcaline ainsi que la réalisation d'antibiogrammes et l'étude du transfert de gènes entre les souches bactériennes obtenues après isolement.

Partie bibliographique

Chapitre 1

La composition bactérienne

I. Définition

Les bactéries sont des êtres vivants unicellulaires (procaryotes), leur taille varie de 1 à 10 microns. Elles ne sont donc visibles qu'au microscope optique ou au microscope électronique. Comme tous les procaryotes, les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) circulaire qui est le support de l'information génétique. Les bactéries peuvent contenir des éléments génétiques mobile extra-chromosomiques de petite taille, appelés les plasmides, ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie dans les conditions habituelles de croissance. (Karima, 2021)

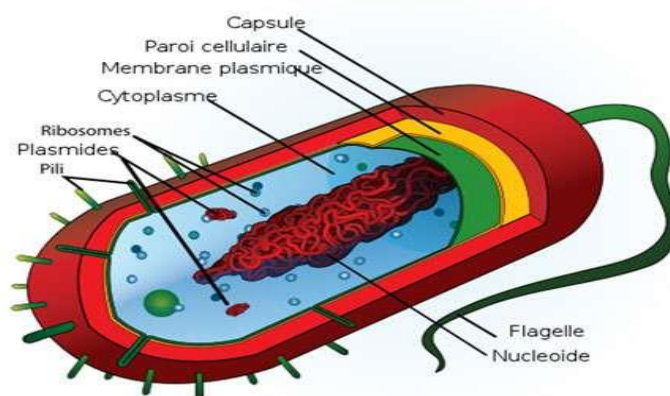


Figure 1: les différents composants d'une cellule bactérienne. (1)

Les cellules bactériennes se présentent sous plusieurs formes comme : les bacilles (bâtonnets), les Cocci-coccus au singulier (sphérique ou ovoïdes) et les formes spiralés (en tire-bouchon ou courbées). Elles sont composées du peptidoglycane (ou muréine), la capsule qui est un facteur de virulence et joue un rôle de protecteur, du cytosquelette responsable de la morphologie de la cellule mais aussi d'importantes fonctions et du cytoplasme ...etc.

II. Composition bactérienne

1. Le chromosome bactérien

La majorité des bactéries possèdent un chromosome unique, circulaire. Ceci étant, certaines de ces dernières peuvent en présenter deux (telle que *Vibrio cholerae* : un grand de 2,9 millions de bases et un petit de 1 million de bases). Celui d'*Escherichia coli* est empacqué et se trouve dans une région appelée « nucleoïde » ou corps nucléaire. La morphologie des corps observés est variable selon la phase de croissance et de division de la bactérie. Chez les Cocci, il est possible d'observer une petite masse sphérique ou ovoïde, souvent centrale. Chez les bacilles, un bâtonnet est situé transversalement dans la cellule. Il est généralement mononucléaire chez

les Cocci et plurinucléaires chez les bacilles. Cet aspect est visible chez les bactéries jeunes en phase exponentielle. L'appareil nucléaire se réplique plusieurs fois avant que la cellule ne se divise. Cet ADN est associé à des protéines notamment des topoisomérases qui interviennent dans le repliement de la molécule d'ADN, par contre, les histones sont absents (ces derniers étant présents chez les eucaryotes). A la place, des polyamines analogues aux histones, tel que la protéine II, riche en Arginine sont retrouvés au niveau de la cellule bactérienne. (Corvec, 2009)

2. Les éléments transposables

1) Les plasmides

L'ADN plasmidique est un ADN bicaténaire de taille variable, qui varie entre 1000 et 25000 paires de base (comparés à 4 millions de pb pour le génome). Une cellule peut contenir un ou plusieurs plasmides situés (s) à l'état libre dans le cytoplasme.

Concernant leur structure, les plasmides peuvent être retrouvés sous trois formes différentes : circulaire covalente fermé, circulaire relâché (l'un des deux brins est coupé) ou sous forme linéaire (les deux brins sont séparés ou bien coupés).

Les plasmides portent généralement des gènes qui ne sont pas essentiels pour la survie de la cellule mais ces derniers jouent un rôle très important quant à l'adaptation de l'hôte avec son environnement. Ils peuvent renfermer des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes codant pour la synthèse d'enzymes intervenant dans un type de métabolisme bien particulier (exemple : la dégradation de certains nutriments : soufre, urée, citrate...). Les plasmides peuvent également porter des facteurs de virulence : des toxines, adhésions. (Yassine, 2015)

- **Réplication des plasmides**

La réplication de l'ADN plasmidique fait largement appel à l'équipement enzymatique de la bactérie hôte. Il existe trois mécanismes généraux pour la réplication des plasmides circulaires, à savoir, le type θ , le déplacement de brin, et le cercle roulant (RC, pour *Rolling circle*).

En général, les plasmides contiennent une ou plusieurs origines « Ori » de réplication et un ou plusieurs éléments régulateurs, situés dans un fragment d'ADN ne dépassant pas 4 kb. Souvent, l'initiation de la réplication nécessite la synthèse d'une protéine appelée « Rep » codée par le plasmide, et qui agit d'une manière spécifique sur l'origine « Ori », avec ou sans l'intervention de la protéine DnaA qui permet l'initiation de la réplication de l'ADN chromosomique.

Le nombre de copies d'un plasmide varie de 1 à quelques dizaines par bactérie, souvent en relation avec leur taille.

Le contrôle de la réplication se fait essentiellement par deux types de mécanismes : L'un utilise une série des séquences répétées, appelées itérons, localisées dans *l'Ori* et sont capables d'interagir avec la protéine de réplication. Le 2ème mécanisme implique la synthèse de petits ARN anti-sens qui s'hybrident d'une façon complémentaire aux transcrits responsables du processus de l'initiation. **(Camidiade, 2019)**

- **Classification des plasmides**

- 1) **Groupe d'incompatibilité**

L'incompatibilité des plasmides est un phénomène lié à la régulation de la réplication et au nombre de copies. Le groupe d'incompatibilité ou « Inc » est l'ensemble des plasmides qui ne peuvent cohabiter dans la même cellule bactérienne. Ceci peut être expliqué par le fait qu'ils utilisent le même système de régulation et produisent le même répresseur, ce qui conduit à la disparition de l'un des plasmides au fil des générations. **(Hortense-Lise, 2019)**

Exemple : Ils existent 28 groupes d'incompatibilité connus chez la famille des Enterobacteriaceae.

Chaque groupe d'incompatibilité possède un spectre d'hôtes donné. Ainsi, il existe les groupes IncA/C, IncP, IncQ, IncH, IncN et IncL/M, entre autres, qui sont à large spectres d'hôtes, pouvant se maintenir de manière stable chez de nombreuses espèces bactériennes, voire différents genres. D'autres, comme les groupes IncF ou IncI sont à spectre d'hôtes étroit. Certaines résistances aux antibiotiques peuvent être associées à des groupes d'incompatibilité. Ainsi les IncF sont souvent associés à la résistance aux aminoglycosides et les IncP sont corrélés avec les résistances aux sulfamides, aminoglycosides et tétracycline. **(Souna D, 2020)**

- 2) **Les facteurs de résistance**

Sont des plasmides qui confèrent des gènes de résistance aux antibiotiques. Cette résistance est transférable par mécanisme de conjugaison entre deux bactéries de la même espèce mais aussi entre espèces de genres différents. Ces plasmides résistent aux métaux lourds et portent des gènes protecteurs aux substances toxiques telles que le cuivre le mercure... etc. **(Akbar, 2016)**

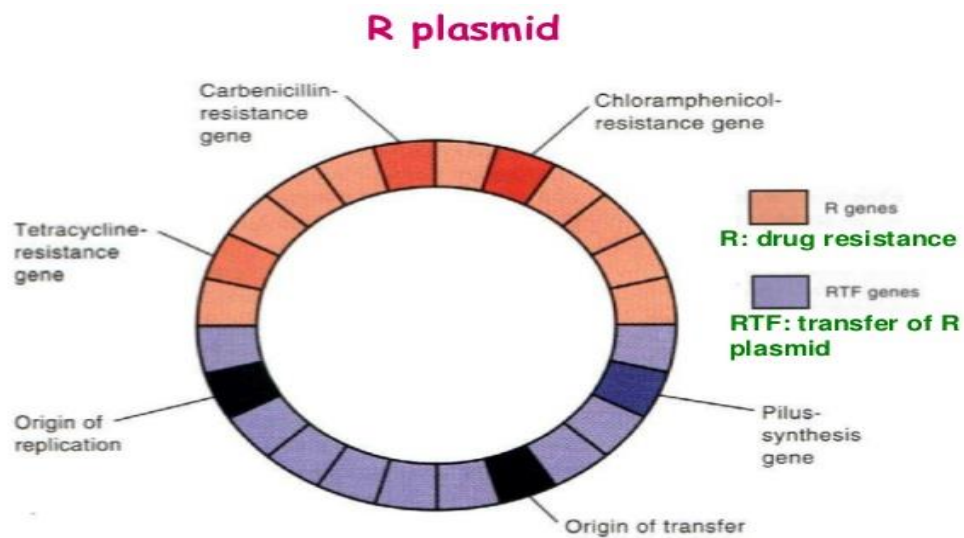


Figure 2: la structure de plasmide R. (Akbar, 2016)

3) Les Facteurs de fertilité

Ces molécules sont responsables du mécanisme de conjugaison et qui possèdent donc la capacité de synthétiser les pili sexuels. Ces dernières sont présentes chez les bactéries possédant le facteur F (bactéries dites F⁺ ou Hfr). Les bactéries F⁻ sont celles qui ne le possèdent pas. (Khouaja, 2019)

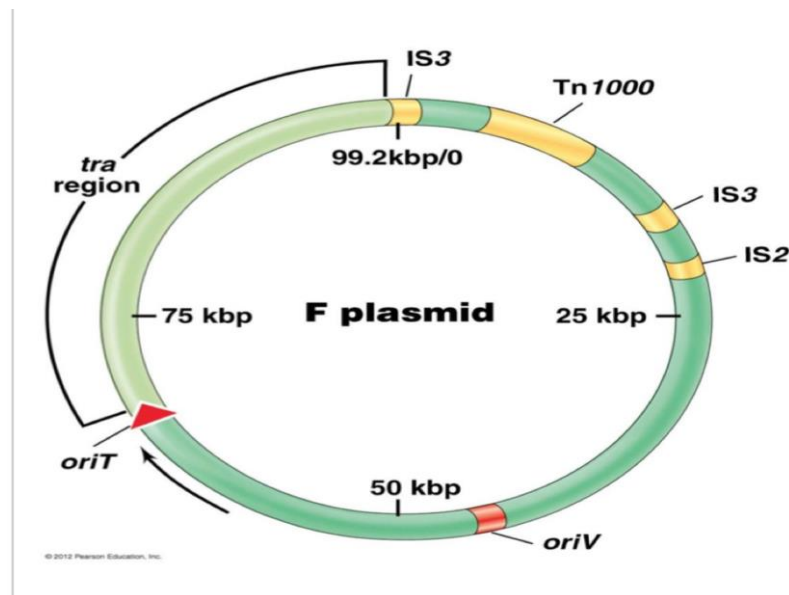


Figure 3: la structure de plasmide F. (Aichour, 2016-2017)

4) Les plasmides Col (colicine)

Ce sont des plasmides responsables de la production de bactériocines : complexes protéiques (toxines) qui permettent la protection de la souche productrice par l'inhibition des espèces qui lui sont proches. (Zia, 2014)

Chaque bactérie synthétise une bactériocine qui lui est spécifique. Exemple : la colicine produite par *E. coli*, la staphylococcine synthétisée par *Staphylococcus aureus*.

Certains de ces plasmides peuvent porter des gènes de résistance et peuvent aussi être conjugatifs. (Fertoul, 2021)

5) Les plasmides de virulence

Sont des plasmides composés des gènes codant pour la virulence et qui rendent la bactérie pathogène par la production de toxines. Ils confèrent également des gènes de résistance aux défenses de l'hôte.

Deux processus sont impliqués dans la virulence des pathogènes :

- a) La colonisation et l'attachement de tissu spécifique.
- b) La production de toxines ou d'enzymes.

Exemples :

Pour *Escherichia coli* : Le facteur de colonisation est un ensemble des protéines codées par des gènes de plasmides sont : les antigènes K qui fonctionnent à l'attachement des cellules épithéliales.

Leur effet pathogène est la synthèse d'au moins deux toxines : l'hémolysine (lyses les globules rouge) et l'entérotoxine (provoquant des diarrhées).

Pour *Staphylococcus aureus* : Synthèse de la coagulase, de l'hémolysine, de la fibrinolysine, et d'entérotoxines. (Fertoul, 2021)

NB : l'antigène K est l'antigène capsulaire (chez les bactéries capsulées).

6) Les plasmides métaboliques

Les plasmides métaboliques portent des gènes qui déterminent la synthèse d'enzymes, lesquelles déclenchent le catabolisme de substances telles que celui de sucres et d'hydrocarbures inhabituels.

Chez *E. coli*, les gènes portés par ces plasmides sont par exemple : l'utilisation du citrate comme source de carbone, la production de soufre, l'hydrolyse de l'urée. Certaines souches de salmonelles sont capables de dégrader le lactose (ce qui est totalement inhabituel chez ce genre bactérien). Le genre *Rhizobium* porte un plasmide métabolique nécessaire pour induire la nodulation chez les légumineuses permettant la fixation de l'azote. (Allouche, 2020)

2) Les séquences d'insertion ou IS

Ce sont de petits éléments génétiques codant uniquement pour l'information nécessaire à leur transposition. Ces séquences contiennent entre 700 et 1600 bp et sont encadrées aux extrémités par deux courts segments inverses de 15 à 25 bp (IR).

Un élément IS contient le signal nécessaire à la transposition, qui est catalysée par une transposase. Un élément IS est flanqué aux deux extrémités par des séquences nucléotidiques identiques ou très similaires en sens inverses ou séquence IR (*inverted repeats*), varient parmi les uns éléments IS de manière à ce que chaque type IS ait des séquences répétitives inverses propres et caractéristiques.

Entre les séquences répétitives inverses, se trouve un gène qui code pour un enzyme « la transposase » : enzyme nécessaire à la transposition qui reconnaît les extrémités des IS avec une grande précision.

Chaque élément IS est désigné par le préfixe IS suivi d'un numéro.

Exemple : Chez E.coli, différents IS sont observés (de IS1 à IS5), avec une longueur de 768 à 1428pb, une séquence répétitive inverse comprise entre 16 et 41 pb, une cible de 3 à 12 pb et un nombre de copies dans le chromosome allant de 1-2 à 10-11. (**Fertoul, 2021**)

3) Les transposons

Les transposons (Tns) sont de courts éléments génétiques mobiles qui peuvent être intégrés dans un autre élément mobile comme les plasmides ou les chromosomes ou par transposition à l'aide de bactériophages pour se déplacer entre les souches bactériennes et peuvent transférer des gènes impliqués dans des fonctions de contingence.

Pour les transposons des procaryotes, le rôle d'un plasmide des transposons dans l'évolution plasmidique mérite un commentaire particulier. Les plasmides peuvent contenir plusieurs sites cible pour les transposons. Par conséquent, les plasmides se déplacent fréquemment d'un plasmide à l'autre. Les transposons ont une grande signification sur le plan médicale puisqu'ils peuvent transférer des gènes résistants à des antibiotiques tels que la pénicilline, le chloramphénicol...etc.Souvent, les transposons se situent les uns à côté des autres dans des plasmides pourvus de facteurs de résistance R. Les bactéries qui abritent un tel plasmide R sont résistantes à tout un ensemble d'antibiotiques différents. (**Allouche, 2020**)

4) Les intégrons

Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme des cassettes. Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique de site médié par une intégrase. Ces cassettes peuvent être présentes dans la cellule soit sous forme d'ADN circulaire, soit intégrées dans un réplicon, comme un plasmide. (Fertoul, 2021)

III. Les bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes sont des bactéries responsables de maladies même chez le sujet " sain " (ex fièvre typhoïde, choléra, tuberculose, méningite...etc.).

Le pouvoir pathogène conditionne le type de maladies et dépend de l'espèce bactérienne responsable de l'infection. Le fait qu'une bactérie pathogène peut transmettre ses gènes à d'autres bactéries sensibles à un ATB. (3)

IV. Les bactéries opportunistes

À l'inverse des bactéries pathogènes, les bactéries opportunistes ne donnent habituellement pas de maladies chez les sujets sains. En revanche, elles peuvent devenir pathogènes chez les sujets aux défenses immunitaires altérées.

Ces bactéries sont souvent des bactéries commensales qui vivent à la surface de la peau et des muqueuses de l'homme. (Espace Etudiant, 2021)

V. Caractéristiques des souches bactériennes

A. *Staphylococcus aureus*

- **Morphologie** : Cocci Gram positif ayant une taille de 0,5 à 1 µm de diamètre. (Anses, 2011)
- **Croissance** : A sporulé et immobile, ce microorganisme aéro-anaérobie facultatif possède une catalase positif et une oxydase peut être négatif ou positif. (Anses, 2011)
- **Habitat** : sont des bactéries ubiquitaires présentes chez les animaux et l'homme et même dans l'environnement naturel ou l'environnement domestique de L'homme. (Anses, 2011)
- **Pouvoir pathogène** : Infection urinaire chez la femme jeune : *S. saprophiticus*
Infections nosocomiales (Infections Associées aux Soins) : matériel médical souillé (sondes, prothèses, valve cardiaque...). (Anses, 2011)

- **Résistance aux antibiotiques** *Staphylococcus aureus* est connu pour être multi résistant aux antibiotiques, notamment à la pénicilline et aux Aminoglycosides. (Anses, 2011)
- **Sérotypes** : À ce jour, 21 sérotypes différents (SEA à SEE, SEG à SEV) ont été décrits, le sérotype le plus fréquent étant le : SEA (détecté lors d'intoxications) comparé à SEE et à SEH. (GPBP, 2017)

NB : la figure est mentionnée dans l'annexe (20, p53)

B. *Salmonella* sp

- **Morphologie** : ce sont des bactéries à Gram négatif avec une paroi épaisse de 8 à 12 nm. (Harizy ,2008)
- **Croissance** : sont des bactéries mésophiles, ayant une température optimale de croissance de 35/37C°. (Harizy ,2008)
- **Habitat** : présente dans le tube digestif des vertébrés. (Harizy ,2008)
- **Pouvoir pathogène** : Les infections à *Salmonella* empruntent généralement la voie digestive. Chez l'homme, elle provoque plusieurs maladies comme la salmonellose, la fièvre typhoïde et parathyroïde. (Henry, 2011)
- **Résistance aux antibiotiques** : fluoroquinolones : ciprofloxacine, ofloxacine, azithromycine, céphalosporines, céfixime et ceftriaxone. (Aubry et al ,2021)

NB : la figure est mentionnée dans l'annexe (21, p53)

- **Sérotype** : les salmonelles possèdent potentiellement trois types d'antigènes ayant un intérêt diagnostique. On distingue des antigènes somatiques (O), des antigènes flagellaires (H) et des antigènes de surface. (Targan, 2010)

C. Les entérocoques

- **Morphologie** : Les Entérocoques sont des cocci Gram+ oxydase positive, généralement catalase négative. (Galvez et al, 2012)

NB : la figure est mentionnée dans l'annexe (22, p54)

- **Croissance** : Ils sont généralement des anaérobies facultatifs et non mobiles ayant une température optimale de 35 C°. (Galvez et al, 2012)
- **Habita** : sont en général des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux et qui peuvent être retrouvées dans l'environnement (sols, eaux, végétaux). Ce sont des indicateurs de contamination fécale et constituent donc une source de contamination indirecte. (Galvez et al, 2012)

- **Pouvoir pathogène** : Ils peuvent être pathogènes opportunistes et sont dans ce cas, responsables d'infections urinaires, d'infections abdominales d'origine intestinale, de septicémies ou encore d'endocardites. (GPBP, 2017)
- **Résistance aux antibiotiques** : les bêta-lactames, les Aminoglycosides, les lincosamides ou les glycopeptides. En 1986, certains *E. faecium* ont montré des résistances à des antibiotiques de type glycopeptides (vancomycine et teicoplanine).

De plus, il est souvent utilisé comme alternative à l'ampicilline, à la pénicilline et aux Aminoglycosides chez les personnes allergiques. (Galvez et al, 2012)

D. *Escherichia. Coli*

Morphologie : *Escherichia coli* (*E. coli*) est une bactérie à Gram négatif. Ce Bacille mobile appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* fut découverte en 1885 par Théodore Escherichia. (Maris, 2016)

- **Croissance** : Aéro-anaérobies facultatifs ayant une croissance optimale à 44 C°. (Clave, 2015)

NB : la figure est mentionnée dans l'annexe (22, p54)

- **Habita** : c'est une espèce commensale du tube digestif et est un indicateur de contamination fécale, également présente dans le tube digestif des animaux à sang chaud. (CEAEQ, 2013)
- **Pouvoir pathogène** :
 - *E coli* entérotoxigènes (*ECET*)
 - *E coli* entéroinvasives (*ECEI*)
 - *E coli* entéro-pathogènes (*ECEP*)
 - *E coli* entérohémorragiques (*ECEH*)
 - *E coli* entéroaggrégatives (*ECEAgg*)
 - **Sérotype** : O157:H7, qui a aussi été le principal microorganisme pathogène responsable de l'épidémie de Walker ton. (CEAEQ, 2013)
 - **Résistance aux antibiotiques** β-lactamines, Aminocyclitol, Fluoroquinolones, fosfomycine-trométanol et nitrofurantoïne. (Clave, 2015)

NB : la figure est mentionnée dans l'annexe (23, p54)

Chapitre 2

Les mutations et le transfert
génétique

VI. Les mutations

Une mutation introduit une modification dans l'information génétique, dans le génotype d'une cellule et est transmissible à sa descendance. Les mutations sont des événements très rares. Une mutation peut toucher au hasard n'importe quel gène, de n'importe quelle cellule, à n'importe quel moment. C'est un événement aléatoire. (Aichour, 2016)

1. Caractères des mutations

Les mutations se caractérisent par leur : spontanéité, rareté, discontinuité, stabilité, spécificité et indépendance. Les mutations peuvent survenir dans des conditions physiologiques normales : ce sont des mutations naturelles, comme elles peuvent survenir sous l'influence de facteurs externes (physiques, chimiques...) on parlera alors de mutations induites. (Aichour, 2016)

a) Spontanéité

Elles apparaissent naturellement aucun agent mutagène n'est associé à leur survenu.

Il s'agit un changement aléatoire au niveau de la séquence nucléotide des gènes. (Aichour, 2016)

b) Rareté

La mutation est un phénomène rare qui n'affecte qu'une faible proportion de l'ensemble de la population bactérienne. C'est la probabilité d'apparition d'une mutation dans un intervalle de temps compris entre 2 divisions. (Aichour, 2016)

c) La stabilité

Le caractère acquis est alors transmissible à la descendance, donc héréditaire même en l'absence de l'agent sélecteur qui ne fait que révéler la mutation. La stabilité n'exclut cependant pas la réversibilité de la mutation. La mutation reverse présente les mêmes caractères que la première mutation. (Aichour, 2016)

d) Indépendance et spécificité

La mutation n'affecte habituellement qu'un seul caractère. La mutation d'un caractère donné ne modifie pas la probabilité de mutation d'un autre caractère. Il y'a indépendance de mutations. Il en résulte que la probabilité qu'une bactérie mute pour deux caractères en même temps est égale au produit des deux probabilités individuelles. (Aichour, 2016)

2. Mécanisme de mutations

Tout changement dans la séquence nucléotidique d'un gène constitue une mutation ce changement peut se faire :

Soit par (substitutions d'une paire de base par une autre paire de base, cette mutation survient dans des points on parlera de mutation ponctuelle.

Soit par cassure de l'ossature sucre-phosphate de la molécule d'ADN avec perte, addition ou inversion de séquence d'ADN entre les deux cassures. (4)

3. Substitutions

La substitution est le remplacement d'un nucléotide par autre dans la structure primaire de l'acide nucléique. Une substitution peut aboutir à des résultats très différents après la traduction cela dépend de sa position par rapport au cadre de lecture. (4)

a) Délétions et insertions

Concernent l'insertion ou la Délétions d'une plusieurs paires de bases désignes sous le terme collectif de mutation inde. (4)

b) Transposition

Les transpositions résultant de l'incorporation d'acide nucléiques synthétisés hors du Génome, par une transposasse qui incorporé ces acides nucléiques dans le génome de la cellule. (4)

4. Types de mutations génétiques**❖ Les mutations chromosomiques**

La **mutation chromosomique** touche plusieurs nucléotides dans l'ADN, si bien que la mutation peut être observée au cours d'un caryotype : Translocation, Duplication, Inversion, Insertion, Délétion. (4)

❖ Les mutations ponctuelles

Une mutation ponctuelle concerne un ou plusieurs nucléotides d'un seul gène. On peut citer :

- **La mutation non-sens** : un codant qui spécifie un acide aminé est remplacé par un codon-stop.
- **La mutation faux-sens** : dans ce cas, un nucléotide vient en remplacer un autre. Selon le cas, la mutation peut entraîner un changement de l'acide aminé codé.

- **La mutation silencieuse** : compte tenu de la redondance du code génétique, la séquence d'une protéine reste intacte, d'où l'appellation « silencieuse ». (4)

❖ Les mutations germinales / somatiques

1. Dans le cas d'une **mutation somatique**, le phénomène ne touche pas les cellules reproductrices, en conséquence, l'altération ne se poursuit pas sur plusieurs générations.
2. Dans le cas d'une mutation germinale, le phénomène touche les cellules destinées à la reproduction. (4)

❖ Les mutations dynamiques

Elles sont le plus souvent observées dans les maladies génétiques, Elles évoluent suivant les générations.

Ces modifications concernent bien évidemment tout l'ADN du corps humain, y compris l'ADN d'un neurone. (4)

VII. Mécanisme de réparation

1. Réparation de la cassure double brin

a) Réparation directe des bases (sans action de polymérase)

Concerne certaines modifications très particulières des bases :

- Dimère de thymine.
- Certaines alkylations.

Ces mécanismes sont limités à quelques altérations bien précises. (khallaf, 2022)

b) Réparation des cassures doubles brin due aux :

Réparation des cassures doubles brin due aux :

- Rayonnements.
- Agents anti tumeur.
- Radicaux.

• Réparation NHEJ ou RH

Légation directe des brins ou recombinaison homologue.

• Mécanismes de réparation par excision de bases (BER)

- Protection des effets secondaires du métabolisme cellulaire.
- Réparation de lésions simples des bases :

- Oxydations
- Alkylations
- Désamination

Sites ap(khallaf, 2022)

2. Réparation de cassures simple brin

a) Mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER)

- Réparation de lésions volumineuses (déformation d'ADN)
- Dimères de thymine (UV).
- Adduits intra brins (Cis platine)

Ici tout un morceau d'ADN sera retiré par un une double incision

b) Mécanisme de réparation des mésappariements (MMR)

Formés par deux nucléotides non complémentaires l'un en face de l'autre.

Dus à :

- Des erreurs de polymérase (juste après la réplication).

Tautomères de bases (en cours de réplication) (khallaf, 2022)

VIII. Le transfert des gènes

C'est l'échange ou la transmission du matériel génétique entre les organismes. Ce transfert peut être fait de façon verticale (via la reproduction) ou de manière horizontale (soit par l'intégration de l'ADN étranger dans une cellule hôte). (Aichour, 2016)

1. Le transfert vertical

C'est le transfert de l'information génétique à la descendance d'une cellule mère à une cellule fille (réplication de l'ADN, puis division). Cela peut se produire par une reproduction sexuée ou asexuée ou bien par des mécanismes artificiels. Chez les bactéries la reproduction asexuée la plus répandue est la fission binaire qui donne deux cellules identiques à la cellule mère. (Zia, 2014)

In vitro il est possible d'obtenir la croissance d'une souche bactérienne dans des milieux de culture spécifiques permettant la réalisation de plusieurs tests tels que la résistance aux antibiotiques. (Aichour, 2016)

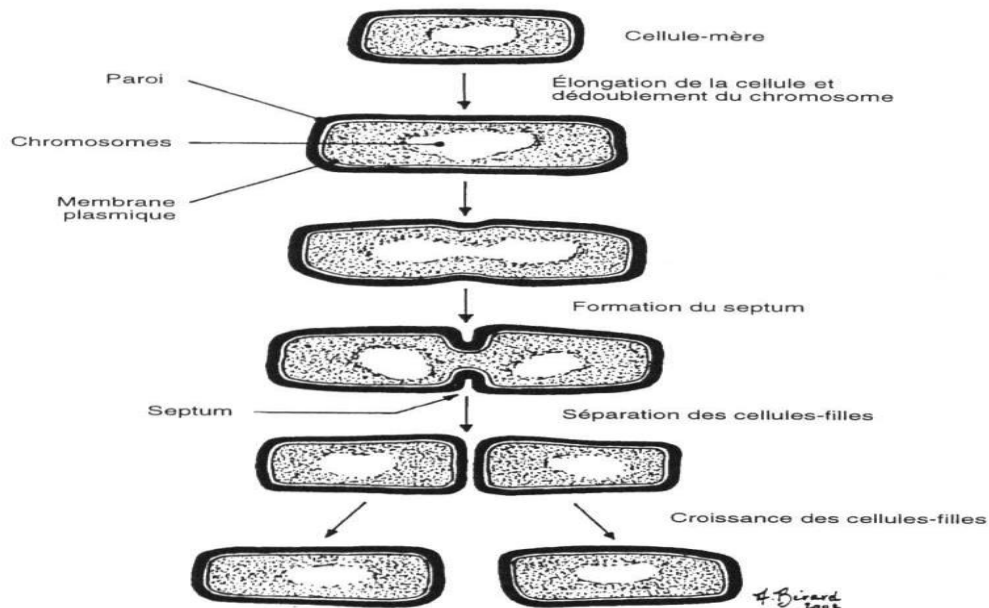


Figure 4: Transfert de gène vertical des bactéries au cours de la fission binaire. (5)

2. Les transferts horizontaux des gènes

Les bactéries sont capables de transférer une information génétique de manière horizontale qui se fait entre deux individus non apparentés.

Il existe trois modes de transfert chez ce type de microorganismes (**Zia, 2014**) :

1) La transformation

A. Naturelle

La transformation est l'incorporation de l'ADN nu libre dans milieu extérieur (exogène) avec le génome d'une cellule hôte qui doit être compétente.

- **L'ADN facteur transformant** : Caractérisé par :
 - ✓ Nu et libre sous forme des fragments de taille variable et structure bicaténaire qui Possède les propriétés physiques de l'ADN.
 - ✓ Inactive par l'ADNase.
 - ✓ Capable de transférés plusieurs caractères : virulence, métabolisme et résistance. (**Zia, 2014**)
- **Compétence du receveur**

Certaines bactéries sont capables d'absorber de l'ADN naturellement. Cependant, ces bactéries prennent seulement de l'ADN à un moment précis de leur cycle de croissance quand elles produisent une protéine spécifique appelée facteur de compétence. Cet état de compétence qui

n'apparaît seulement que chez une fraction de la population bactérienne. La transformation naturelle ne peut s'observer chez un nombre limité d'espèces bactériennes à Gram positif (*Pneumococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus*) ou à Gram négatif (*Neisseria*, *Branhamella*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*). (Zia, 2014)

Le développement de l'état de compétence Chez les bactéries à Gram positif sont excrète un activateur spécifique d'espèce, qui se fixe à la surface de la bactérie. Il y a ensuite synthèse d'une protéine fixatrice de l'ADN, d'une autolysine et d'une endonucléase. L'ADN fixé est ensuite partiellement hydrolysé puis converti en un fragment monocaténaire. Chez les bactéries à Gram négatif, l'état de compétence est aussi en relation avec la synthèse d'un activateur de paroi qui est excrété par la bactérie à la phase exponentielle de croissance chez *H. influenza*, ou à la phase stationnaire comme c'est le cas d'*Acinetobacter*. (Fertoul, 2021)

- Le mécanisme de transformation

L'ADN à l'état bicaténaire se fixe au niveau d'un site récepteur (30 à 80 sites par cellules) ; l'ADN adsorbé porte des coupures simples brin. La pénétration dans la cellule fait intervenir une endonucléase membranaire qui sert d'ADN translocase en dégradant l'un des brins et favorise la pénétration de l'autre, cette intégration se fait par recombinaison avec déplacement de la chaîne homologue du receveur pour former un segment hétéro duplex. La taille moyenne des fragments intégrés est de 10 à 20 Kb et plusieurs insertions sont possibles par chromosome.

Le mécanisme de transformation est sensiblement différent chez les bactéries à Gram négatif en raison de la particularité de la paroi. (Germain, 2012)

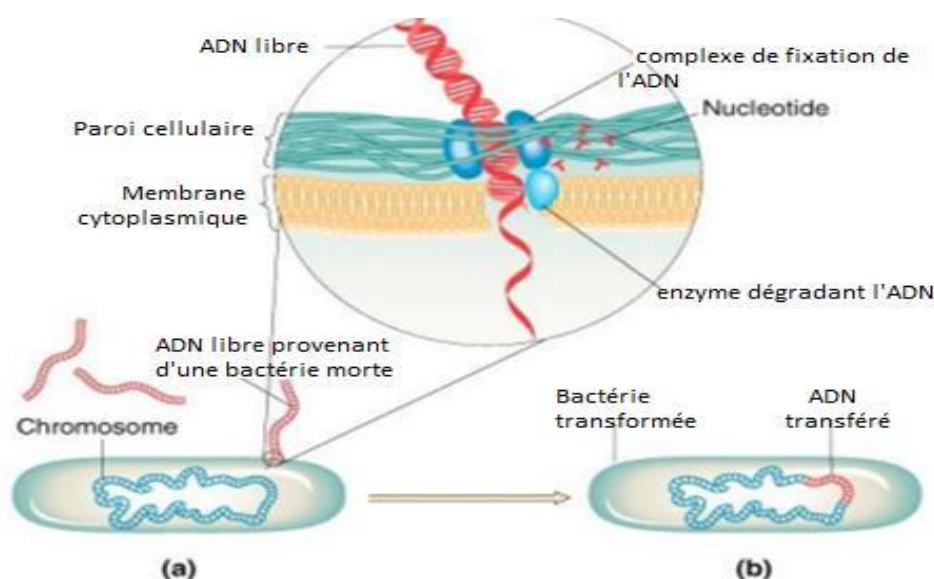


Figure 5: Transformation bactérienne, (a) fixation de l'ADN nu, (b) intégration du fragment d'ADN après recombinaison homologue. (Fertoul, 2021)

B. Artificielle

La compétence artificielle résulte du traitement physique, chimique, thermique, et/ou électrique des cellules. A titre d'exemple, l'électroporabilisation, la formation de protoplastes ou encore le traitement combiné de chocs thermiques en présence de CaCl_2 , sont des techniques largement utilisées pour transformer des organismes qui ne sont pas naturellement compétents. (Narimane, 2017)

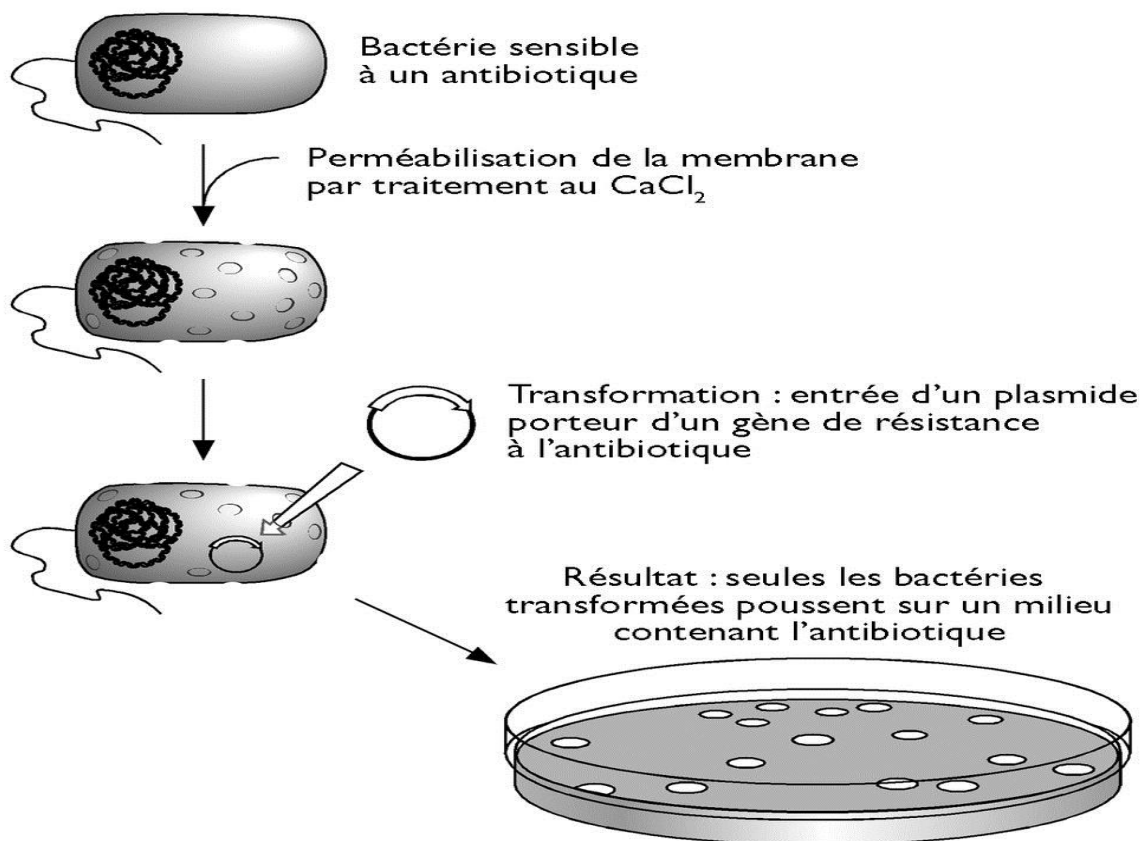


Figure 6 : technique de transformation artificielle d'une bactérie sensible à un antibiotique par le traitement de CaCl_2 . (6)

2) La conjugaison

La conjugaison est un mécanisme par le biais duquel de l'information génétique est transférée après établissement d'un contact physique entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice, et ce grâce à la mise en place d'une machinerie protéique (pili, adhésines).

De façon analogue à la transformation et la transduction, l'intégration de l'ADN acquis par conjugaison au sein du chromosome de la bactérie réceptrice, ou sa re-circularisation sont requises pour son maintien et transmission à la descendance. (Khouaja, 2019)

- **Chez les Grams négatifs (-)**

Le prolongement de la surface de la cellule donneuse qui établit un pont avec la cellule receveuse contribue à mettre les deux bactéries en contact direct. Le plasmide se réplique au cours de la conjugaison en même temps une seule copie monocaténaire est transférée à la bactérie receveuse où le brin complémentaire est synthétisé.

Au final, la cellule (F-) devient (F+). (**Khouaja, 2019**)

- **Chez les Grams positifs (+)**

Dans ce cas, le mécanisme est différent, en particulier chez quelques genres bactériens tels que *Staphylococcus* et certains *Enterococcus*, le contact ne se fait pas par les pili sexuels.

Dans le milieu externe les receveurs relâchent des peptides diffusibles, les phéromones qui induisent chez les donneurs (porteurs de plasmides conjugatifs), qui provoque la formation de grands agrégats entre les souches bactérienne F⁺ et F⁻ ces derniers sont les sites de transfert génétique dont les mécanismes demeurent encore inconnus. (**Khouaja, 2019**)

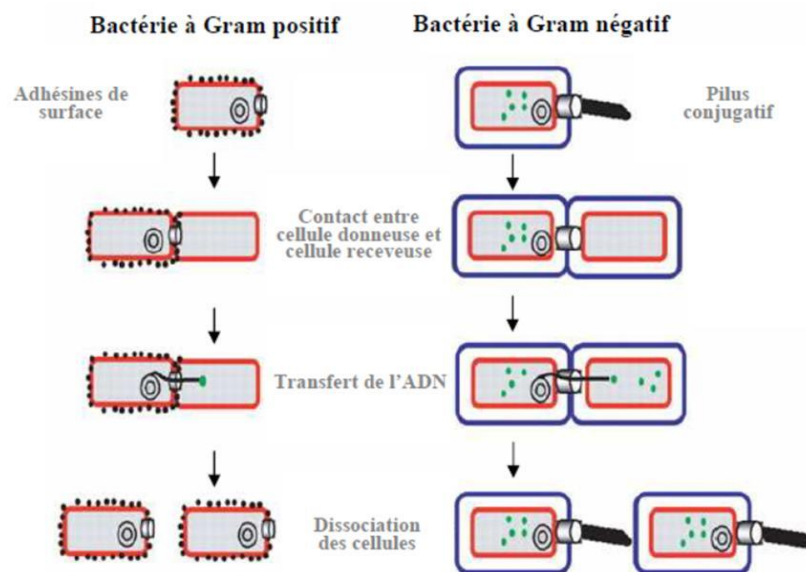


Figure 7: Comparaison entre la conjugaison chez les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. (7)

- **Les souches Hfr**

Le facteur F est un épisode qui peut s'intégrer dans le chromosome bactérien sur de nombreux sites différents par recombinaison homologue, ce type de donneur est appelé Hfr (haute fréquence de recombinaison).

Après contact entre la cellule Hfr et F⁻ l'ADN chromosomique répliqué à partir du point *Ori* (origine de réplication) est transféré à la cellule réceptrice de façon linéaire.

La durée de conjugaison dépend de la localisation des gènes l'*Ori*. La cellule participante porte des marqueurs (gène) de la cellule Hfr donatrice sont appelés exconjugants. (Khouaja, 2019)

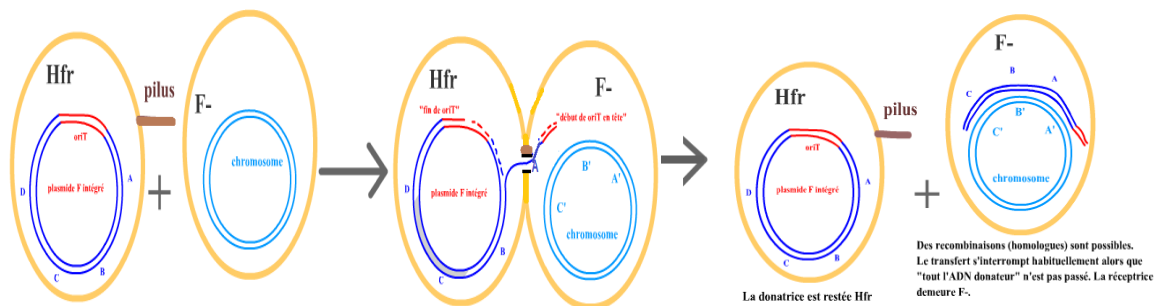


Figure 8: mécanisme de conjugaison Hfr entre deux bactéries.

(Khouaja, 2019)

3) La transduction

C'est le transfert indirect de matériel bactérien entre deux bactéries plus ou moins proches phylogénétiquement, par l'intermédiaire d'un bactériophage, qui jouent donc le rôle de vecteur. Ces échanges de gènes peuvent être une origine de la dissémination dans la population bactérienne. (Khouaja, 2019)

- **Les bactériophages**

Sont des organismes qui infectent les bactéries, chaque type des phages infectent des bactéries d'un seul genre, d'une seule espèce ou d'une seule souche, Ils possèdent les mêmes caractéristiques que les virus et sont donc des parasites intracellulaires obligatoires. En générale, les bactériophages portent l'information génétique sous des formes différentes réunir en quatre grands groupes morphologiques : les phages à ADN bi caténaire, avec queue, les phages sans queue, à symétrie cubique et à ADN monocaténaire, les phages à ARN et les phages filamenteux à ADN monocaténaire. (GPBP, 2017)

Le tableau vu d'ensemble des différentes familles de bactériophages et leurs caractéristiques, (dB=double brin ou Sb=simple brin) est mentionné dans l'annexe (p55).

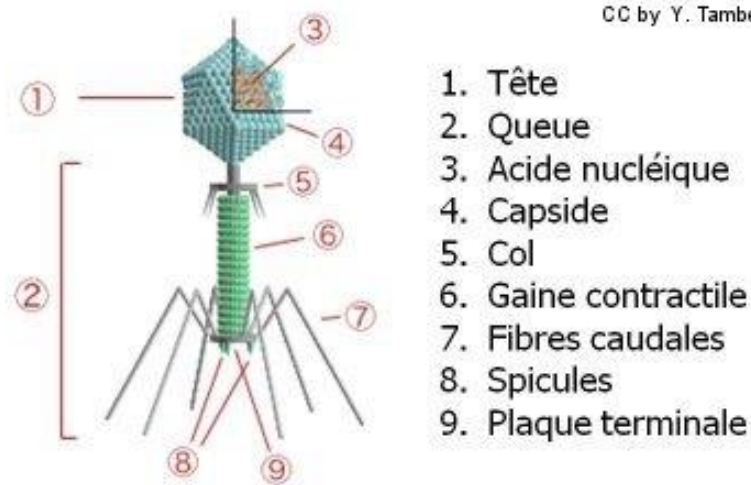


Figure 9: Structure générale d'un bactériophage. (8)

Les phages peuvent infecter les bactéries soit par : Infection lytique (phage lytique) dans ce cas les phages exploitent les ressources matériels et énergétiques de la bactérie pour produire de nouveaux virus qui vont s'accumuler à l'intérieur de la cellule, après quelques heures de l'infection la libération des phages par explosion de la cellule (c'est la lyse bactérienne). Soit par : Infection non lytique ou lysogénie (phages tempérés) : L'intégration de l'information génétique du phage dans le génome bactérien (prophage) et l'expression des gènes viraux nécessaires au début de la réplication virale est empêchée (c'est la lysogénie). (Schlemmer, 2016)

Schéma explicatif : voir l'annexe (p55)

Chapitre 3

Mode d'action des antibiotiques

IX. Mode d'action des antibiotiques

1. Définition des antibiotiques

Un antibiotique peut être soit une molécule naturelle, synthétique ou semi-synthétique qui va empêcher la multiplication des bactéries ou entraîner leur destruction en agissant sur une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Autrement dit, il peut posséder soit une activité bactéricide qui dans ce cas, va détruire les bactéries ou au contraire avoir un effet bactériostatique et ralentir la croissance bactérienne pouvant aller jusqu' à l'arrêt total de la croissance. (Taha Ahmed ,2012)

2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les principaux sites d'action des antibiotiques sont la paroi bactérienne, les ribosomes, l'ADN bactérien, la membrane cytoplasmique. Pour résumé, les quatre principaux mécanismes de résistance sont l'imperméabilité, l'inactivation enzymatique, la modification de la cible de l'antibiotique et l'efflux actif. (GPBP, 2017)

Cela dit, ces mécanismes d'action peuvent être détournés par les microorganismes qui développent des résistances pour contrer l'action de ces molécules via le phénomène de mutation ou de transmission de gènes de résistance.

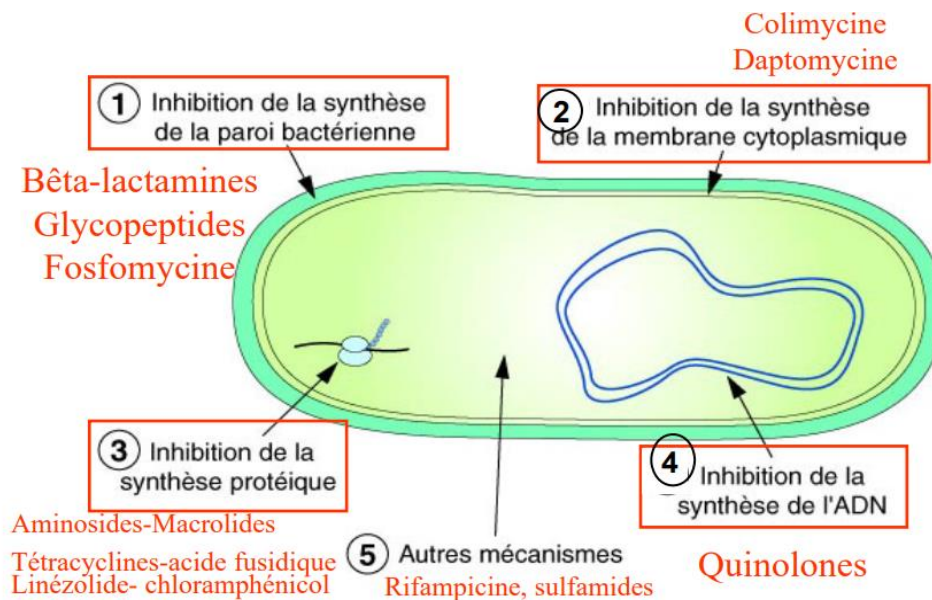


Figure 10: Mécanisme de résistance chez les bactéries liées aux modes d'action des antibiotiques. (GPBP, 2017)

3. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance est la propriété que possède une souche bactérienne pour éviter que sa croissance ne soit inhibée ou stoppée sous l'effet d'un antibiotique. **(Taha Ahmed ,2012)**

➤ **Les types de résistance bactérienne**

- Résistance naturelle ou intrinsèque

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie, la résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. **(Mainardi, 2012)**

- Résistance acquise :

Les bactéries, préalablement sensibles à un antibiotique, peuvent développer une résistance à cet antibiotique, ce qui implique des changements génétiques chromosomiques ou extra-chromosomiques. Elles ne concernent que quelques souches, d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique donné. **(Taha Ahmed, 2012)**

➤ **Exemples de résistance chez d'autres microorganismes**

D'autres microorganismes peuvent également présenter une résistance tel que les virus (Une résistance à la plupart des antiviraux s'est développée, y compris aux antirétroviraux (ARV), les champignons (A la différence des antibiotiques qui agissent en différents points des bactéries, les antifongiques agissent principalement au niveau de la membrane cellulaire des champignons. En la perforant, les antifongiques rompent l'intégrité de la cellule et entraînent leur mort) ...etc. **(10)**

Matériel et méthodes

1. Objectif de l'étude

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

Le but de ce travail fut l'extraction de l'ADN plasmidique de bactéries pathogènes isolées à partir du lait de vache cru.

2. Matériel biologique

Les souches bactériennes ont été isolées à partir du lait de vache cru, d'autres nous ont été fournies par un laboratoire privé (Chaib) à Azzaba. Ces dernières ont été extraites à partir d'urine et de pus.

Durant toute la durée des analyses, les souches ont été conservées sur milieux de culture spécifiques et ont été repiquées dans le but de revivifier ces dernières.

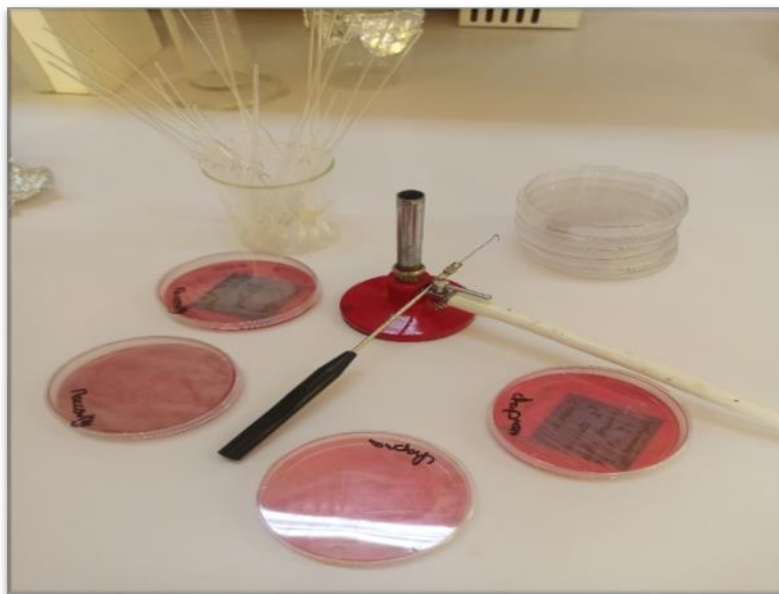


Figure 11: les différentes souches bactériennes utilisées.

- Les souches de *Staphylococcus aureus* ont été conservées sur milieu Chapman.
- Les souches d'*Escherichia coli* ont été conservées sur milieu EMB.
- Les souches de *salmonella* ont été conservés es sur milieu Mac conkey.

3. Repiquage des souches

Le repiquage a pour objectif de revivifier les cellules bactériennes et diminuer le risque de contamination par la réalisation d'un ensemencement par épuisement.



Figure 12: repiquage des souches bactériennes avec un ensemencement par épuisement sous forme des stries.

Concernant les tests : la coloration de Gram, catalase et oxydase ont été effectués pour la confirmation et l'identité de chaque bactérie étudiée.

Le protocole de chaque test est détaillé dans l'annexe (p56).

4. Protocole de conjugaison entre deux souches bactériennes

Au cours de ce test, un croisement entre deux souches bactériennes *staphylococcus aureus* résistance (S4) et l'autre sensibles (S2 et S3) a été réalisé.

La bactérie F+, ayant le facteur F, possède également un gène de résistance à la pénicilline G et à l'érythromycine.

La souche F- étant au contraire, sensible à la pénicilline G et à l'érythromycine.

Les étapes sont détaillées dans l'annexe (p56-57).

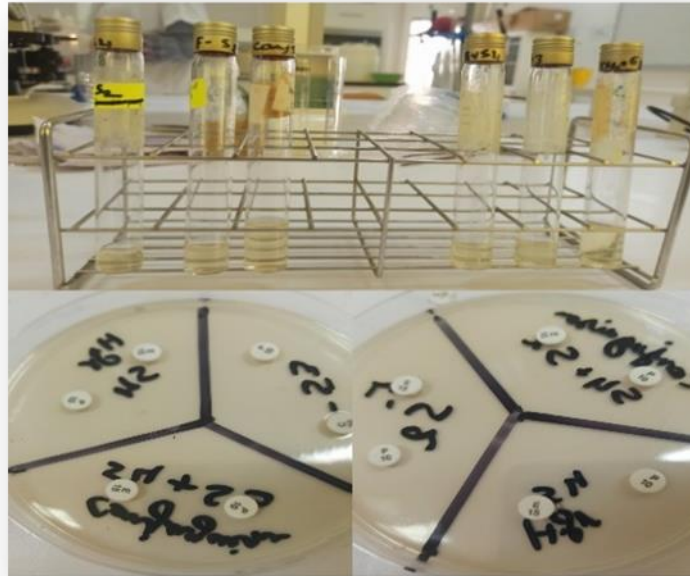


Figure 13: les différentes étapes du test de transfert entre les bactéries (conjugaison).

5. Extraction de l'AND plasmidique

L'extraction a pour but de séparer l'ADN plasmidique de l'ADN chromosomique à partir des bactéries pathogènes. La technique la plus répandue comprend une étape de lyse alcaline.

Dans l'extraction on a suivi le protocole suivant :

➤ **Récupération et lavage des cellules**

- Après la mise en culture des souches bactériennes dans le milieu LB (*Luria Bertani*) liquide ce milieu permet la mise en culture de toutes les bactéries en présence d'un antibiotique de sélection. Le but étant obtenir les cellules bactériennes ayant incorporé la gène de résistance à l'antibiotique.
- Prélever 1,5ml de suspension bactérienne et placer en micro tube stériles.
- Centrifugation à 120000 g (pendant 3 min).
- Élimination du surnageant puis en ajout 1,5ml de la suspension bactérienne.
- Centrifugation à 120000 g (pendant 3 min).
- Elimination du surnageant (à ce stade le surnageant contient le milieu de culture ainsi que des résidus d'antibiotiques et le culot quant à lui contient les cellules bactériennes ayant sédimenté)
- Le culot est récupéré et placé dans un micro tube stérile neuf et mis en suspension dans 150 µl de tampon tris-HCL 25 Mm pH : 8 ; EDTA 10 mM.

➤ **La lyse cellulaire**

- Ajout de 300 µl de soude 0,2 M, SDS 1 % préparé extemporanément ; laisser agir 5 min maximum (en utilise pas la centrifugeuse).
- Ajout de 225 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 pour réaliser la précipitation de l'ADN chromosomique dénaturé par la soude et des protéines complexée par SDS (détergeant).
- Mélanger par retournements successifs 6 à 10 fois.
- Placer les tubes dans la glace pendant 10 min.
- Centrifugation à 12000 g (pendant 10 min) à température ambiante ; suite à cette étape l'ADN génomique étant insoluble va sédimenter (culot) et ADN plasmidique restera en suspension (surnageant).
- Récupération du surnageant (contenant l'ADN plasmidique).
- Ajout 2 volume d'éthanol absolu à -20°C et placer à -20°C pendant 30 min dans le but de précipitation d'ADN plasmidique.
- Centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 15 min.
- Elimination de surnageant.
- Remettre le culot en suspension dans 300 µl d'éthanol à 75 %.
- Centrifugation pendant 15 min à 12000 g à 4°C.
- Elimination du surnageant.
- Séchage du culot pendant quelques minutes à 37 °C ; dans le but d'éliminé l'éthanol.
- Remise du culot en suspension dans 50 µl d'eau distillé stérile ou TE, pour facilite la mesure et éviter la précipitation.

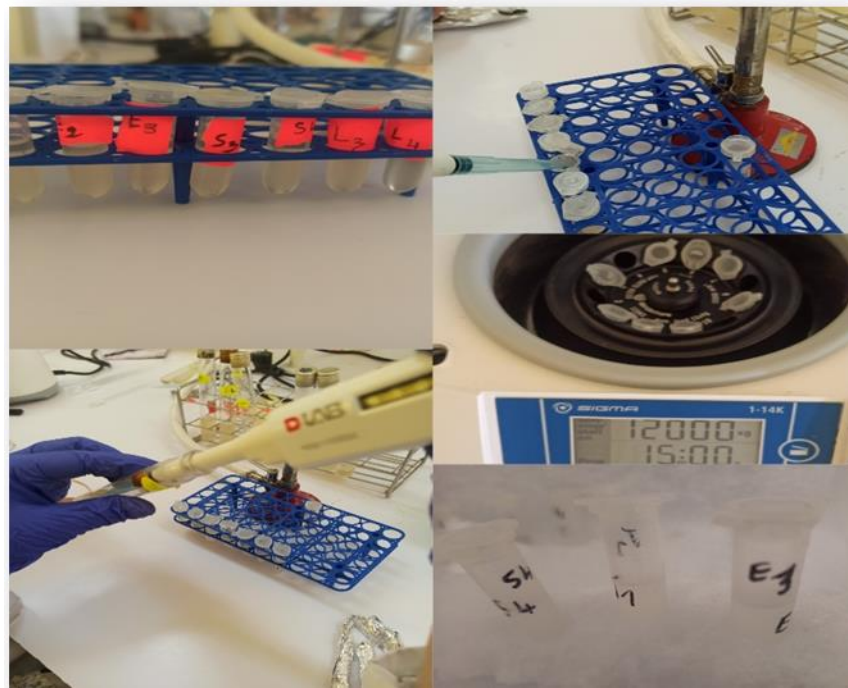


Figure 14: les différentes étapes de l'extraction de l'ADN plasmidique.

6. Dosage par spectrophotométrie

Une des méthodes les plus simples et fréquemment utilisées pour déterminer la quantité d'acide nucléique présente dans une solution consiste à mesurer la quantité de lumière d'une longueur d'onde spécifique qui est absorbée par cette solution.

Cette méthode a pour but de mesurer la quantité de l'ADN plasmidique et la vérification de sa pureté.

Après extraction de l'ADN plasmidique par la méthode de Birnboim 1979, ce dernier a été transféré dans une cuve contenant de l'eau distillé stérile à la place d'une solution aqueuse de Tris-EDTA afin de faciliter la mesure et éviter sa précipitation. (Houria et al, 2017)

Les étapes sont détaillées dans l'annexe (p58-59)

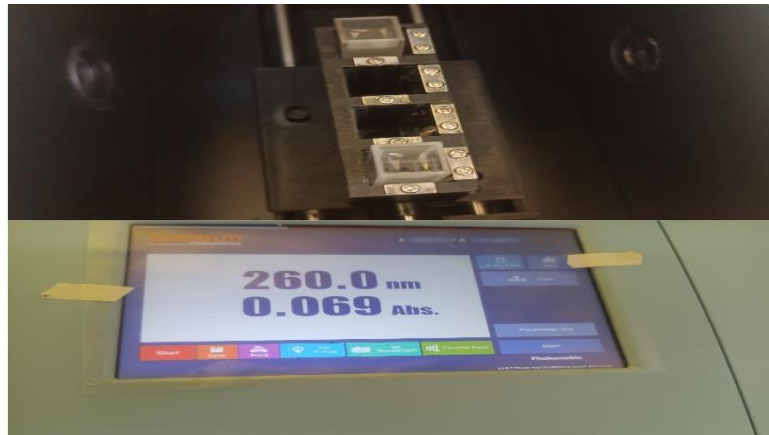


Figure 15: Appareillage de spectrophotométrie.

Résultats et discussion

1. Résultats relatifs aux analyses microbiologiques :

A. Tests d'identification bactérienne :

Tableau 1: résultats du test de la catalase et de l'oxydase des différentes souches bactériennes étudiées (*E. coli*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp).

Espèces	Souches	Catalase	Oxydase
<i>E. coli</i>	E1	-	-
	E2	-	+
<i>Salmonella</i> sp	L1	-	-
	L2	-	-
	L3	-	+
	L4	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	S1	+	+
	S2	+	-
	S3	+	-
	S4	+	-
<i>Enterococcus</i> sp	T1	-	+
	T2	-	+

Tableau 2: résultats du test de coloration de Gram pour les souches de (*E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*).

Espèces	Souches	Gram
<i>E. coli</i>	E1	-
	E2	-
<i>Salmonella</i> sp	L1	-
	L2	-
	L3	-
	L4	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	S1	+
	S2	+
	S3	+
	S4	+
<i>Enterococcus</i> sp	T1	+
	T2	+

B. L'antibiogramme

Tableau 3: résultats des antibiogrammes effectués pour les souches *E. coli*, *Salmonella* sp et *Staphylococcus aureus* en présence de gentamicine, de chloramphénicol, d'érythromycine, et de pénicilline.

-		Antibiotiques			
Espèces	Souches	Gentamicine	Chloramphénicol	Erythromycine	Pénicilline
<i>E. coli</i>	E1	S	S	-	-
	E2	S	S	-	-
<i>Salmonella</i> sp	L1	S	S	-	-
	L2	S	S	-	-
	L3	S	S	-	-
	L4	S	S	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	S1	S	S	S	S
	S2	S	S	S	S
	S3	S	S	S	S
	S4	S	S	R	R

NB

R : pour résistante,

S : pour sensible

- : non testé

- **Discussion**

- **La gentamicine**

Après lecture des antibiogrammes, il a été noté que toutes les souches appartenant aux espèces étudiées sont sensibles à la gentamicine et au chloramphénicol. En effet, la gentamicine a pour rôle d'inhiber la synthèse protéique au niveau des cellules bactériennes en agissant au niveau de la sous-unité 30S ribosomale.

(Cette perturbation est due à une mauvaise reconnaissance du codon de l'ARNm par l'ARNt chargé, il en résulte des erreurs de traduction protéique qui sont à l'origine de la perte (la mort) des cellules bactériennes). (Mainardi, 2001)

- **Le chloramphénicol**

Le chloramphénicol (ayant un effet bactériostatique) agit également en inhibant la synthèse protéique au niveau de la sous-unité 50S ribosomale (70S) en se fixant sur le site de fixation de l'ARN t (ARN de transfert) ce qui a pour conséquence l'arrêt de l'élongation de la chaîne protéique. (Quincampoix, 2001)

- **Pénicilline G**

Parmi les quatre souches de *Staphylococcus aureus* étudiées, les souches S1, S2 et S3 ont été notées sensibles à la pénicilline G.

Cette molécule a pour rôle d'inhiber la synthèse de la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif en bloquant la synthèse des peptidoglycanes par fixation sur les récepteurs PLP (protéine de liaison aux pénicillines) au niveau de la paroi bactérienne.

La résistance de la souche S4 vis-à-vis de la pénicilline G est expliquée soit par le fait que la bactérie possède des gènes codant pour la synthèse de β -lactamases agissant sur la molécule ATB, soit par la modification du PLP au niveau de la paroi bactérienne.

L'enzyme bêta-lactamase (pénicillinase) de type acide clavulanique, tazobactam ou sulbactam est synthétisée à partir des gènes chromosomiques ou plasmidiques, cette enzyme hydrolyse le cycle bêta-lactame de la pénicilline G et la rend inactive.

Le deuxième mécanisme de résistance repose sur la diminution de l'affinité à la pénicilline G via les récepteurs membranaires PLP (protéine de liaison des pénicillines) qui possèdent une activité enzymatique (transpeptidases, carboxypeptidases ou glycosyltransférases) impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne.

Le mécanisme impliqué peut résulter de mutations au sein des gènes chromosomiques (*mecA*) codant pour les PLP. (Quincampoix, 2001)

➤ **L'Erythromycine**

Les trois souches de *S. aureus* (S1, S2 et S3) sont sensibles à l'Erythromycine, contrairement à la Souche S4 qui est résistante. La sensibilité des bactéries à l'Erythromycine est dû à l'inhibition de la translocation du ribosome par fixation au niveau de la sous-unité 50s du ribosome 70s sur l'ARNr 23s pour former un domaine V qui contient le centre peptidyl transférase. Ce processus a pour but de bloquer la sortie du peptidyl-ARNt.

La résistance de la souche S4 à cet antibiotique est dû à l'un des trois mécanismes suivants :

• **L'inactivation enzymatique :**

Ce processus étant associé à la présence d'estérases codées par les gènes *empC*, *ereA* et *ereB*.

Les produits des gènes *ere* provoquent l'inactivation hydrolytique du cycle lactonique des macrolides à 14 et 15 chaînons et sont à l'origine de l'inactivation des macrolides par la

Bactérie. Et sont dans ce cas, à l'origine d'une résistance de haut niveau à l'Erythromycine.

D'autres enzymes peuvent être la cause de résistance de S4 sont les phosphotransférases, ces derniers sont portés sur des éléments génétiques mobiles codés par le gène *MphB* qui joue un rôle dans le développement de la résistance aux macrolides pour la souche de *S. aureus*, où il phosphoryle les macrolides dans les lactones contiennent 14- et 16-carbones dans le cycle lactone. Les phosphotransférases introduisent un phosphate dans le groupe 20-hydroxyle du sucre aminé des macrolides et le rendent inactif.

• **La modification de la cible :**

Par altération enzymatique du site cible :

La modification du site de liaison de l'antibiotique conduit à un mécanisme de résistance de haut niveau et est le plus souvent constaté pour les antibiotiques MLSB (macrolides-lincosamides-streptogramine B).

La souche synthétise une enzyme de méthylation (l'adényl-N-Méthyltransférase) codée par les gènes *emr* de classes *ermA*, *ermB* et *ermC* qui sont Localisé au niveau des plasmides. Leur fonction est La méthylation de l'adénine de l'ARNr 23S qui empêche les macrolides de se lier à leur site cible sur le ribosome bactérien. (Camberlein, PhD, 2022)

- **La pompe efflux**

Le but étant de diminuer l'accumulation des antibiotiques entrant à l'intérieur de la cellule à travers des canaux et sont donc rejetés vers le milieu extérieur.

Ces Transporteurs sont des pompes efflux de nature protéique codées par des gènes localisés aux niveaux du chromosome. Les gènes portés par *S.aureus* (*msrA* et *msrB*) sont responsables d'un phénotype de résistance de type MS, c'est-à-dire d'une résistance inductible vis-à-vis des macrolides dont le noyau comporte 14 et 15 carbones (C14 et C15), après induction par l'Erythromycine, Le gène *mef* entraîne un phénotype de résistance nommé M, caractérisé par une résistance limitée aux macrolides en C14 et en C15. (**Gangoue ,2007**)

C. La transmission des gènes de résistance par mécanisme de conjugaison

- ✓ Résultats du test de la potentielle transmission de gènes de résistance *via* conjugaison entre la souche S4 (donneuse F+) et les souches S2 et S3 (sensibles : potentiellement receveuses F-)

La souche S2



Avant conjugaison



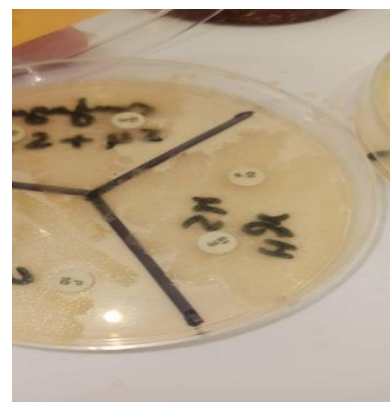
Après la conjugaison

Figure 16: résultat de transfert par conjugaison des gènes de résistance entre S4 et S2.

La souche S3



Avant conjugaison



Après la conjugaison

Figure 17: résultat de transfert par conjugaison des gènes de résistance entre S4 et S3.

- **Discussion**

Après mise en contact directe de la souche S4 (résistante) avec les souches S2 et S3 (sensibles) pendant 24h à 37°C.

Nous avons constaté que ces deux dernières, qui à la base étaient sensibles, ont pu croître sur milieu LB en présence de pénicilline G et d'érythromycine. Cela signifie qu'il y a eu transfert unidirectionnel des gènes de résistance de la souche S4 (donneuse F+) aux souches S2 et S3 (receveuses F-) après « conjugaison ». Cela signifie que ces gènes de résistance sont portés par les plasmides.

La liaison entre les bactéries se fait *via* les pili sexuels permettant la formation d'un pont cytoplasmique entre les deux cellules. Suite à cela, le transfert des plasmides portant les gènes de résistance a lieu : l'origine de réplication *OriT* est répliqué par un mécanisme de cercle roulant.

Une fois le transfert effectué, la bactérie receveuse devient F+ et porte donc les gènes de résistance tandis que la bactérie donneuse conserve ses propres gènes.

2. Résultats relatifs aux analyses de biologie moléculaire :

D. L'extraction d'ADN plasmidique

✓ Résultats obtenus suite à l'extraction de l'ADN plasmidique par la lyse alcaline

L'ADN précipite en formant une « pelote », qui remonte lentement à la surface. A l'aide d'un cure-dent il est possible de prélever la pelote et de se rendre compte de l'aspect visqueux des filaments d'ADN.



Figure 18: obtention de l'ADN plasmidique.




✓ **Résultat de spectrophotomètre**

Tableau 4: les valeurs d'absorbance de l'ADN plasmidique extrait dans l'eau distillée.

Les souches	A 260	A 280	DO 260nm / DO 280nm
T1 (S)	0.037	0.011	3.36
E2 (S)	0.048	0.026	1.84
E3 (S)	0.052	0.028	1.85
L3 (S)	0.042	0.024	1.75
L4 (S)	0.047	0.025	1.88
S3 (S)	0.102	0.053	1.92
S4 (R)	0.084	0.043	1.95

S : sensible à l'antibiotique.

R : résistante à l'antibiotique.

-  Contamination par des ARN.
-  Contamination par des protéines
-  ADN PUR

• **Discussion**

L'extraction d'ADN plasmidique par la lyse alcaline repose sur les valeurs de pH qui sont maintenues dans un intervalle très étroit ce qui permet la dénaturation de l'ADN chromosomique uniquement

(L'ADN plasmidique étant super enroulé est protégé).

➤ **Dosage par spectrophotomètre :**

Les résultats du spectrophotomètre sont illustrés dans le tableau qui décrit les valeurs d'absorbance de l'ADN plasmidique purifié dans l'eau distillée stérile aux longueurs d'ondes 280 nm et 260 nm.

Les résultats du rapport (DO 260nm / DO 280nm) montrent que l'absorbance de 5/7 de nos extraits est situé entre 1,8 et 2. Autrement dit, ces ADN plasmidiques obtenus sont purs.

Pour l'échantillon T1, son absorbance est de 3.36, ce qui signifie que l'échantillon est contaminé par des ARN.

L'absorbance de l'ADN plasmidique de la souche L3 est de 1.75, cet échantillon est contaminé par des protéines en raison de l'absence de la protéinase K (nécessaire lors de l'extraction d'ADN et ayant pour rôle de digérer les protéines liées à la molécule d'ADN).

NB : la méthode d'extraction de l'ADN plasmidique par lyse alcaline a été choisie car c'est une méthode simple et qui ne nécessite pas l'utilisation de produits toxiques (tels que le phénol et le chloroforme). (**Fatima Zahra et al, 2017**).

Conclusion

Conclusion

Les liquides biologiques peuvent véhiculer des agents infectieux très divers telles que les bactéries.

Dans ce travail, les bactéries ont été isolées à partir de liquides biologiques divers (lait de vache cru, prélèvements d'urines et de pus).

Une souche de *Staphylococcus aureus* s'est montrée résistante à la pénicilline G et à l'érythromycine. Les tests de transmission de gènes entre espèces ont montré la transmission du gène de résistance à la pénicilline G entre la bactérie donatrice (résistante) à la bactérie réceptrice (sensible), ce qui prouve que le gène de résistance est porté par l'ADN plasmidique bactérien et est donc transmissible d'une espèce à une autre ce qui est un réel danger en raison de l'émergence de nouvelles souches résistantes ce qui a pour conséquence de diminuer l'efficacité des antibiotiques.

Les tests de biologie moléculaire ont permis d'obtenir des échantillons purs c'est le cas des échantillons (E2, E3, L4, S3, S4). L'échantillon (L3) est contaminé par les protéines (L3) et l'échantillon (T1) est contaminé par les ARN

Les techniques de biologie moléculaire ont démontré leur utilité pour étudier la résistance bactérienne.

L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique ainsi que la réalisation d'autres tests complémentaires permettent dans ce cas d'étudier en détails le phénomène d'antibiorésistance chez les bactéries ainsi que la transmission des gènes responsables de ce fléau.

**Références
Bibliographiques**

Références bibliographiques

A

- 1- **Abdouelmouhamadi Akbar, 2016.** Chapitre 1 : la technologie de l'ADN recombinant.
- 2- **Adel Khouaja, 2019.** Analyse génétique des procaryotes la génétique bactérienne.
- 3- **Allouche, 2020.** Cours M1 BPA Bio Mol Chapitre 3.
- 4- **Ana Aguilar-Galvez, Robin Dubois-Dauphin, Jacqueline Destin, David Campos, Philippe Thonnard, 2012.** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique).
- 5- **(ANSES), 2011.** Agence nationale de sécurité sanitaire. Alimentation, environnement, travail. *Staphylococcus aureus* et enter toxines staphylococciques.

B

- 6- **B. Schlemmer, 2009.** Réanimation Médicale. P 999.
- 7- **Begloul Fatima Zahra. Belarbi Fouzia, 2017.** Extraction d'AND à partir du sang du mouton. Master en biologie Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 32p.
- 8- **Ben kemouche Houria. Boukharouba Asma. Boussaha Nour-Elhouda, 2017.** De molécule de la résistance bactérienne plasmidique. Mémoire de master. Université 8 Mai 1945 Guelma. 53p.

C

- 9- **Camille Humieres, 2019.** Les phages véhiculent des gènes de résistances.
- 10- **(CEAEQ), 2013** Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* thermo tolérants dans les échantillons solides ou semi-solides : méthode par filtration sur membrane utilisant le milieu de culture Mfc-BCIG.

D

- 11- **Dillenseger Hortense-Lise, 2019.** Les bactériocines : en alternative aux traitements antibiotiques. Université de bordeaux. Diplôme d'état de docteur en pharmacie.
- 12- **DR Saffidine Karima, 2021.** Cour Génétique microbienne. Université de médecine-Setif.
- 13- **Dr. Danielle CLAVE, 2015.** *Escherichia coli*. Fiche technique. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique.
- 14- **DR.S. Mezaache-Aichour, 2016-2017.** Génétique microbienne. Université de Sétif.

E

- 15- **Elsa Germain, 2012.** Mise en évidence du rôle central joué par le régulateur global Ma dans la physiologie de *Bacillus subtilis*. Université Aix-Marseille. Thèse de Doctorat.

16- **Emilie Camberlein, PhD, 2022.** Microbiologie et immunologie On ligne. Université South Carolina.

17- **Espace Etudiant, 2021.** Cours de Bactériologie Générale.

G

18- **(GPBP), 2017** Guide Pratique des Bactéries Pathogènes.99p.

K

19- **khallaf, 2022.**Cour master 2.Système de réparation. Université 8 mai 1945 Guelma.

H

20- **Harizy Khalil, 2008/2009.** Recherche identification des bactéries pathogènes salmonella et listeria dans les aliments. Université de gabés. Rapport de stage. Institut supérieur de biologie appliqué et médecine.

21- **Hayette Targan, 2010.** L'îlot de multi résistance aux antibiotiques, Salmonella Génomique Island 1 (SGI1) : variabilité, diffusion inter - espèces et implication dans la virulence. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1.

22- **Haythem Yassine, 2015.**Etude de la séquence d'insertion IS1294b et de son implication dans la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques chez les entérobactéries. Université de Bordeaux. Thèse de doctorat.132p.

I

23- **Introduction, 2014.**73p.

24- **Isabelle henry, 2011.** Epidémiologie analytique de Salmonella subsp. Enterica et de Campylobacter spp. Dans les élevages de poulets de chair à la Réunion. Investigation des sources infectieuses de Salmonella subsp. Enterica de la production à la transformation. Thèse de doctorat. Université de la Réunion.229p.

J

25- **J.C. Quincampoix, 2001.** Mécanismes de résistance des Cocci à Gram positif. p268-273.

26- **J.L. Mainardi, 2012.** Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques/ Session interactive autour de l'antibiogramme. Université Paris René Descartes.

27- **Josef Gangoue Piobiji, 2007.** Caractérisation des bêta -lactamase et leur inhibition par les extraits de plante médicinale. Université de Liège. Thèse de doctorat.105p.

M

28- **Mathilde Camiade, 2019.** Persistance de bactéries entériques antibiorésistantes ou pathogènes sur des végétaux de consommation humaine (modèle : la laitue). Université de Rouen Normandie.345p.

29- **Meriem Laouar, 2018.** Essais de biodégradation du pesticide Abamectine par *Pseudomonas putida*. Université Badji Mokhtar –Annaba. Diplôme de Master.

N

30- **Narimane Dahmane, 2017.** Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICESt3 et des facteurs influençant leur mobilité. Université de Lorraine. Thèse de doctorat. 181p.

R

31- **R Pierre Aubry. Docteur Bernard-Alex Gaüzère, 2021.** Les salmonelloses. Université de Bordeaux (France).

32- **R. Gharzouli Fertoul, 2021-2022.** Génétique des Procaryotes.

S

33- **Sékolène Maris, 2016.** Caractérisation de souches d'*Escherichia coli* pathogènes urinaires provenant de Guadeloupe : portrait de la diversité des facteurs de virulence présents. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie Appliquée. Université du Québec. 95p.

34- **Souna D, 2020.** Eléments de la génétique moléculaire des microorganismes. Université de Chlef.

35- **Stephane Corvec, 2009.** Laboratoire de bactériologie. UFR de médecine-nates.

T

36- **Taha Ahmed Ben Abbou, 2012.** Diplôme de magister en biotechnologie. Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées des produits artisanaux algériens. Université d'Oran. 113p.

Z

37- **Zuchuat, 2015.** La conjugaison

Sites web

- 1-<https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-bacterie-101/>
- 2- https://fr.123rf.com/photo_32520410_bact%C3%A9ries-diff%C3%A9rence-de-gram-positif-%C3%A0-partir-de-bact%C3%A9ries-%C3%A0-gram-n%C3%A9gatif-.html
- 3-https://mobile.twitter.com/BIRDlab_ENS/status/1072895394936438784
- 4-<http://www.microbes-edu.org/etudiant/streptocoques.html#:~:text=Les%20ent%C3%A9rocoques%20sont%20de%20plus,entr%C3%A9e%20urinaire%2C%20g%C3%A9nitale%20ou%20intestinale.>
- 5- <https://www.francepaternite.com/caracteristiques-et-d%C3%A9roulement-de-la-mutation-ADN/>
- 6-<http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55523&demande=desc>
- 7-[file:///C:/Users/Yoga/Downloads/important%20\(1\)%20\(1\)%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Yoga/Downloads/important%20(1)%20(1)%20(1).pdf)
- 8- <https://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/bacteriophage/>
- 9-[https://interactive-programme.europa-organisation.com/slides/programme_ricai-2018/20181218/87-20181218_1130_Salle_352_B_DHUMIERES_Camille_1111_\(69\)/DHUMIERES_Camille_20181218_1130_Salle_352_B.pdf](https://interactive-programme.europa-organisation.com/slides/programme_ricai-2018/20181218/87-20181218_1130_Salle_352_B_DHUMIERES_Camille_1111_(69)/DHUMIERES_Camille_20181218_1130_Salle_352_B.pdf)
- 10-[https://interactive-programme.europa-organisation.com/slides/programme_ricai-2018/20181218/87-20181218_1130_Salle_352_B_DHUMIERES_Camille_1111_\(69\)/DHUMIERES_Camille_20181218_1130_Salle_352_B.](https://interactive-programme.europa-organisation.com/slides/programme_ricai-2018/20181218/87-20181218_1130_Salle_352_B_DHUMIERES_Camille_1111_(69)/DHUMIERES_Camille_20181218_1130_Salle_352_B.)
- 11-
https://ar.m.wikipedia.org/wiki/%D9%85%D9%84%D9%81:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg
- 12-
<https://ar.m.wikipedia.org/wiki/%D8%B3%D9%84%D9%85%D9%88%D9%86%D9%8A%D9%84%D8%A7#/media/%D9%85%D9%84%D9%81%3ASalmonellaNIAID.jpg>
- 13-
https://ar.m.wikipedia.org/wiki/%D9%85%D9%83%D9%88%D8%B1%D8%A9_%D9%85%D8%B9%D9%88%D9%8A%D8%A9#/media/%D9%85%D9%84%D9%81%3AEnterococcus_histological_pneumonia_01.png
- 14-<https://www.topsante.com/themes/escherichia-coli>
- 15-<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02938084/document>

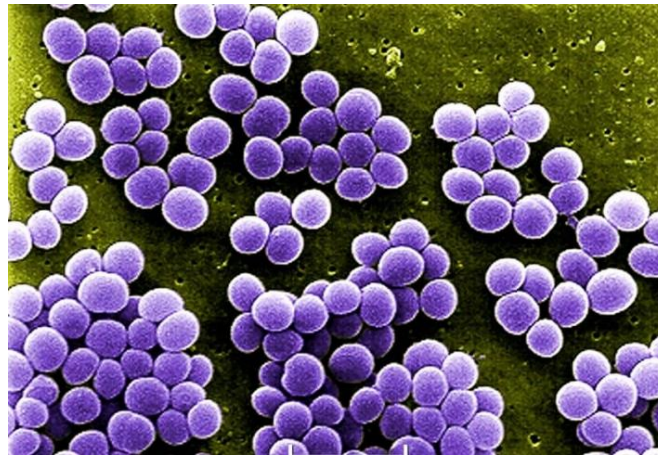


Figure : *Staphylococcus aureus* sous microscope électronique. (11)



Figure : *Salmonella* sous microscope électronique. (12)

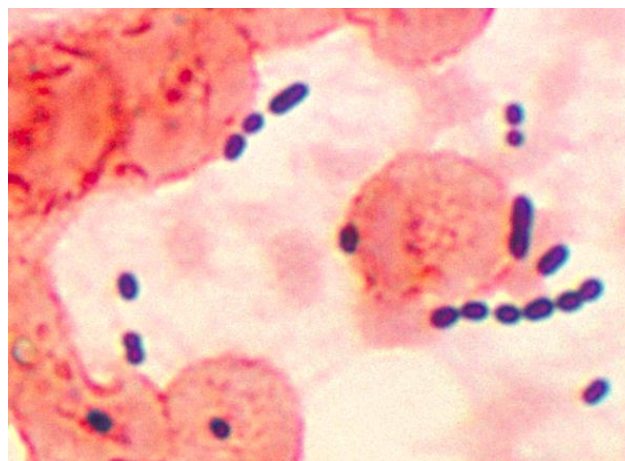


Figure : *Enterococcus sp* sous microscope électronique. (13)



Figure : *Escherichia coli* sous microscope électronique (G×1000). (14)

Tableau : Vue d'ensemble des différentes familles de bactériophages et leurs caractéristiques, (dB=double brin ou Sb=simple brin). (15)

Forme	Famille	Symétrie	Acide nucléique	Nombre
	Myoviridae	Binaire	ADN, <u>db</u>	1312
	Siphoviridae		ADN, <u>db</u>	3262
	Podoviridae		ADN, <u>db</u>	771
	<u>Microviridae</u>	Cubique	ADN, <u>sb</u>	38
	<u>Corticoviridae</u>		ADN, <u>db</u>	3
	<u>Tectiviridae</u>		ADN, <u>db</u>	19
	<u>Leviviridae</u>		ARN, <u>ss</u>	38
	<u>Cystoviridae</u>		ARN, <u>db</u>	3
	<u>Inoviridae</u>	Hélicoïdale	ADN, <u>sb</u>	66
	<u>Plasmaviridae</u>	Complexe	ADN, <u>db</u>	5

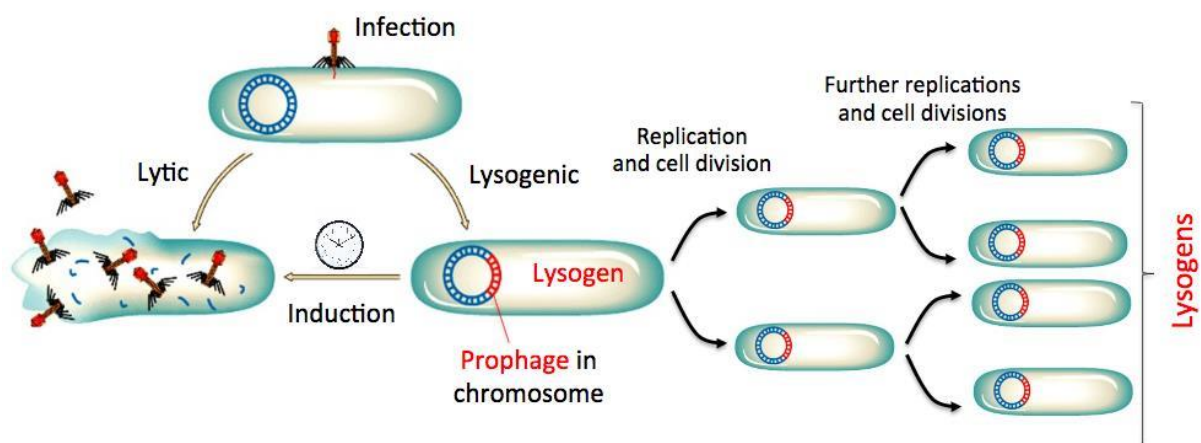


Figure : mécanisme de transduction et le cycle lytique et lysogénique des bactériophages.
(humieres, 2019)

1. Analyse les caractères des bactéries

1.1. Coloration de Gram

✓ Principe

Permet initialement de différencier les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif en se basant sur leurs propriétés tinctoriales liées à la composante de leur paroi. (Meriem, 2018)

1.2. Test de l'oxydase

✓ Principe

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.

Le résultat de ce test est déterminant lors du choix de la galerie biochimique :

Si oxydase (+) : Bactérie aérobie stricte (Non-entérobactérie)

Si oxydase (-) : Bactérie anaérobie (Entérobactérie). (Meriem, 2018)

1.3. Test de la catalase

✓ Principe

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. (Meriem, 2018)

2. Protocole de conjugaison entre deux souches bactériennes

➤ Étape 01

- Inoculation de 10 ml de milieu LB avec la souche F+ (donneuse)
- Inoculation de 10 ml de milieu LB avec la souche F- (receveuse)

➤ Étape 02

- Utilisation de 3 tubes : « F+ », « F - » et « conjugaison »
- Ajout de 4 ml de la suspension dans les tubes « F+ », « F - ».
- Fermeture des tubes et mélange pas inversion.
- Dans le tube « conjugaison », ajout de 1 ml de la culture et F+ 1 ml de culture F-.
- Fermeture du tube, mélange par inversion.

- Incubation des tubes à 37°C environ 60 minutes sans agitation
- **Une fois les 60 minutes écoulées**
 - Prendre une des boîtes. À l'aide d'un marker, tracer sur le fond de la boîte un cadran de tel sorte qu'elle soit séparée en trois parties. Noter ces trois parties, F+, F- et conjugaison.
 - Récupérer le tube de culture « conjugaison » et vos tubes F+ et F-.
 - À l'aide d'anse de platine ensemencé sur boîte colle par milieu gélosé LB sous forme strié en zigzag la partie correspondante de chaque boîte.
 - Ajout les disques d'antibiotiques avec l'aide de pince dans les trois partis correspondants
 - Refermer vos boîtes et les incubé à l'envers à 37° toute la nuit (24h). (**zuchuat, 2015**).

3. Dosage par spectrophotométrie

- **Réglage du spectrophotomètre**
 - Calibrage du spectrophotomètre.
 - Sélection de la longueur du chemin optique de la cuve.
 - Choisir le facteur (ADN plasmidique).
 - Avant chaque mesure de DO, le blanc est placé dans le puits de l'appareil (En orientant la cuvette de telle manière à ce que la lumière la traverse par les faces transparentes) à ($A_{260} = 0$) et ($A_{280} = 0$).
 - Le « Zéro optique », est obtenu en cliquant sur le bouton « Zéro ».
 - La cuvette du blanc est ensuite remplacée par celle de la solution et la valeur est obtenue en cliquant sur « Enter ».
 - Veiller à ce que la référence réglée soit renouvelée périodiquement.
 - Mesurer une quantité connue d'acide nucléique pur afin de contrôler la fiabilité de la référence fixée.

- **Mesure d'un échantillon d'ADN plasmidique**

En fonction de la capacité de la cuvette utilisée, des quantités spécifiques de solution d'ADN sont utilisées afin d'évaluer la concentration (par exemple, pour une cuvette d'une capacité inférieure à 2 ml, on dilue 5 µl d'ADN dans 195 µl d'eau). Après étalonnage du spectrophotomètre et de la solution d'acide nucléique à ajouter, la solution est mélangée et l'absorbance est mesurée. La quantité d'ADN plasmidique extraite (simple et double brin) a

été calculée par spectrophotométrie en mesurant à 260nm (longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques) et 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines)