

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
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: science de la nature et la vie
Spécialité/Option: biologie moléculaire de procaryotes
Département: biologie

Etude moléculaire de la résistance bactérienne plasmidique

Présenté par : Ben kemouche Houria

Boukharouba Asma

Boussaha Nour-Elhouda

Devant la commission composée de :

Ben Benbelkacem S.	Président	Université de Guelma
Khallef M.	Encadreur	Université de Guelma
Grara N.	Examineur	Université de Guelma
Drif F.	Membre	Université de Guelma
Khanaka K.	Membre	Université de Guelma
Athamniya M .	Membre	Université de Guelma

Juin 2017

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 promotrice et directrice de mémoire madame « Khallef M » maître de conférence à l'université 8 mais 1945 de Guelma 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 remercions également :

Madame « Benbelkacem S » Maître assistante à l'Université 8 mais 1945 de Guelma pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme « Grara N » Maître conférence à l'Université 8 mais 1945 de Guelma pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail

Nos remerciements s'adressent également à

*Les membres de commission *Mme Khanaka k* et *Mme Drif F* et monsieur *Athamnia M* participés à ce jury.*

Nous remercions également tous les personnes de laboratoire pédagogique et la bibliothèque de l'université 8 mais 1945 de Guelma pour ces accueils et ces contributions dans ce travail.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Dédicace

Je dédie cet humble travail

A Mes très chers parents

Abd Allah et Fouzia

Pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans faille, Je les remercie de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours vous m'avez transmis l'amour de la science et le savoir.

A ma tendre, gentille et adorable sœur Soumia .

A ma poupé ma cristal Malek

A mes fleurs Ritel et Allaa.

A ma chère amie Amina et son fil Mouhamed amine

Aux perles de mon cœur qui je l'aime beaucoup khaoula et Nour

(Asma)

Dédicace

Je dédie cet humble travail

A Mes très chers parents Rachid et Tounes

Pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans faille, Je les remercie de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours vous m'avez transmis l'amour de la science et le savoir.

A mes chers frères Issam et Aymen , ma fierté dans cette vie.

A mes chères cousines Zineb, Aicha, Hadjer , Iman, Khouloud , Fatima et Mouna en témoignage de mes plus profondes amitiés.

A mes poupées mes fleurs Anfal, hadil, et Nour-Hane

A ma cousin Ahmed et le petit garçon ma chere Abd-anour

A mes chères amies Nadjat, Loubna, Faiza, Kanza, Akila, Amina et son fil Mouhamed amine

Aux perles de mon cœur qui je l'aime beaucoup Asma, Nour et ma cristal ma sœur ma moitié Nabila.

Houria (khaoula)

Dédicace

Je dédie cet humble travail

A Mes très chers parents

Salah et Louiza

Pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans faille, Je les remercie de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours vous m'avez transmis l'amour de la science et le savoir.

A ma cher frère Amar, ma fierté dans cette vie.

A ma tendre, gentille et adorable sœur mon amie Loubna .

A mes chères cousines Warda , Mimiya , Najiba , Hayat , Zahra, Nada, Meriem , Leila, Afaf, Besma, Ismahan, Amira, Raja, Amal, Arij, Ritaj, Ahmed en témoignage de mes plus profondes amitiés.

A ma chère amie , Amina et son fils Mouhamed amine

Aux perles de mon cœur qui je l'aime beaucoup Asma, Khaoula et ma poupé Hayet

(Nour-elhouda)

Liste des abréviations

R : résistance

S : sensible

ATB : antibiotique

Facteur F : facteur de fertilité

Facteur R : facteur de résistance

Facteur col : facteur de colicinogène

Pc : promoteur

Tn : transposon

Int : intégrons

I.M : intégrons de multirésistance

S.I : super intégrons

Int-Tn : integrase

Xis-Tn : excisionase

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

Hfr : haut fréquence de recombinaison

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie I: Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Biologie moléculaire des bactéries nosocomiales

I. Infection nosocomiale.....	2
1. Définition	2
2. Agents responsables d'infection nosocomial	2
II. Résistance bactérienne aux antibiotiques	3
1. Types de résistance	3
1.1. Résistance naturelle.....	3
1.2. Résistance acquise	4
2. Mécanismes de la résistance	4
2.1. Inhibition enzymatique	4
2.2. Altération de la cible.....	4
2.3. Pompes à efflux	5
III. Support génétique de la résistance	5
1. Plasmides	5
1.1. Définition	5

1.2. Réplication de plasmide	6
1.3. Classifications des plasmides	6
2. Intégrons	10
2.1. Définition.....	10
2.2. Types de l'intégrons	11
2.3. Cassettes	12
2.3.1. Définition	12
2.3.2. Structure des cassettes	13
2.4. Mécanisme d'intégration	13
3. Transposons	14
3.1. Définition.....	14
3.2. Types des transposons	14
3.2.1. Séquences d'insertion (IS)	14
3.2.2. Transposons composites.....	15
3.2.3. Transposons non composites (Tn3)	15
3.2.4. Transposons conjugatifs	16
3.3. Mécanisme de la transposition	16
3.3.1. Transposition conservative	16
3.3.2. Transposition réplivative	17

Chapitre 2: le transfert génétique bactérien

I. Transformation.....	19
1. Généralité.....	19
2. Définition.....	19
3. Etat de compétence :	20
4. ADN transformant	21

5. Absorption et la sort de l'ADN.....	21
II. Conjugaison	22
1. Généralité.....	22
2. Définition.....	24
3. Modes de transfert par conjugaison chez les Gram ⁻	24
4. Conjugaison chez les bactéries Gram +.....	26
III. Transduction.....	27
1. Généralité.....	27
2. Définition.....	28
3. Morphologie de phage	28
4. Types de transduction	30
4.1. Transduction généralisée.....	30
4.2. Transduction spécialisée	31
4.3. Conversion lysogénique.....	32

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel biologique.....	33
II. Culture des bactéries	33
III. Extraction de l'ADN plasmidique.....	36
IV. Spectrophotométrie	39
V. Electrophorèse	40

Résultats et discussion

I. Résultats	43
--------------------	----

1. Extraction de l'ADN plasmidique	43
2. Concentration d'ADN plasmidique	43
3. Electrophorèse	47
II. Discussion	49
Conclusion.....	53

Résumé

Abstract

ملخص

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	L'incompatibilité du plasmide	7
2	La structure du plasmide F	8
3	Plasmide multirésistance (plasmide R)	9
4	Structure d'intégrons	11
5	Structure de cassette	13
6	Intégration des cassettes dans des intégrons	14
7	Structure des transposons	16
8	La transposition conservative	17
9	La transposition répllicative	18
10	La découverte de la transformation bactérienne	19
11	La transformation par l'ADN	22
12	La preuve de la conjugaison bactérienne	23
13	L'expérience du tube en U	24
14	Le transfert par la conjugaison.	26
15	Comparaison entre la conjugaison chez les bactéries gram positif et les bactéries gram négatif	27
16	Structure du phage	29
17	Cycle lysogénique d'un bactériophage	31
18	Le cycle lytique d'un bactériophage	32
19	L'ensemencement des souches sur des milieux d'isolement spécifiques.	33
20	Les étapes de l'extraction de l'ADN plasmidique	38
21	Les étapes d'électrophorèse	42
22	Précipité d'ADN plasmidique.	43
23	Les concentrations en ADN des souches utilisées	46
24	Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique.	48

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Principaux types des plasmides.	10
2	Quelque exemple de bactériophage	29
3	Les caractères génétiques des souches utilisées.	34
3	Les caractères génétiques des souches utilisées (suite)	35
4	Les valeurs d'absorbance d'ADN plasmidique extrait dans l'eau distillée stérile.	44

Introduction

Introduction

L'émergence au sein des structures sanitaires des germes résistants aux antibiotiques suite à l'usage abusif de ces derniers et La progression des résistances bactériennes aux antibiotiques confronte les médecins à des infections difficiles à traiter et pose un problème de santé publique. Les bactéries résistantes sont souvent la cause des infections nosocomiales aggravant le pronostic des malades, prolongeant leur hospitalisation et augmentant les coûts des traitements **(Billy, 2002)**.

Cette résistance aux antibiotiques est codée par des gènes qui peuvent être porté, soit sur le chromosome bactérien, soit sur des éléments extrachromosomiques (plasmide), ces gènes peuvent aussi se transposer, et s'échanger entre les différents réplicons sur le chromosome et les plasmides **(Guillot, 2002)**.

Le problème de l'émergence des bactéries pathogènes résultant par la capacité des bactéries à échanger du matériel génétique par trois mécanismes : la transformation, la conjugaison et la transduction dans des conditions de pressions antibiotiques, implique un programme de surveillance et de suivi **(Billy, 2002)**.

De ce fait l'objectif de ce travail était de chercher et de mettre en évidence la détection de la résistance d'origine plasmidique aux antibiotiques des bactéries responsable d'infections nosocomiales.

Notre étude comporte deux grandes parties :

Partie théorique comporte deux chapitres en relation avec les infections nosocomiales et le support génétique de la résistance bactérienne plasmidique et leur transfert du matériel génétique.

Partie expérimentale qui consiste à extraire l'ADN plasmidique des souches bactériennes résistantes à un ou plusieurs antibiotiques, ensuite nous vérifions la quantité d'ADN plasmidique par le spectrophotomètre et leur existence dans un profil électrophorétique.

Partie I:
Synthèse Bibliographique

Chapitre 1

Biologie moléculaire des bactéries nosocomiales

I. Infection nosocomiale

1. Définition

L'infection nosocomiale est toute infection qui survient chez un patient dans un de loi supérieurs ou égale 48h après son admission à l'hôpital, compliquant sa pathologie initiale (les infections que le patient apporte à l'hôpital, et qui s'y manifestent cliniquement, ne sont pas considérer comme des infections nosocomiales). Les infections nosocomiales, avant l'ère des antibiotiques, étaient si fréquentes et présentaient une telle létalité que l'on peut se demander aujourd'hui comment on a pu convaincre les patients d'aller à l'hôpital à l'époque. Avec l'instauration des mesures d'hygiène, leur nombre a diminué et, avec l'introduction des antibiotiques, leur létalité s'est fortement réduite. Mais elles sont toujours là, pouvant devenir dangereuses pour le patient et compromettre les plus belles réussites médicales. Les infections nosocomiales peuvent se développer à partir de la flore d'un patient (infections endogènes) ou à partir de sources extérieures (infections exogènes). Les infections endogènes sont les plus fréquentes, dans cette situation, le patient peut apporter l'agent infectieux à l'hôpital. Mais le plus souvent, la peau et les muqueuses du patient sont colonisées en 1-3 jours par des bactéries hospitalières souvent multirésistantes, qui prennent la place de la flore propre du patient. Ainsi beaucoup des infections endogènes sont causées par la flore spécifique hospitalière. La source d'infection des infections exogènes est principalement le personnel soignant, la plupart du temps, les germes transmis par les mains lors des actes médicaux et de soin. Plus rarement, le soignant est lui-même infecté ou colonisé par la flore hospitalière. Des causes importantes d'infection nosocomiale sont aussi présentées par l'environnement (eau, nutrition, poussière, air) et par les actes médicotéchniques et de diagnostic invasifs qui permettent aux agents infectieux de trouver une porte d'entrée dans l'organisme (**kayser et al., 2008**).

2. Agents responsables d'infection nosocomiale

- **Bactéries**

Elles sont au premier plan en tant qu'agents des infections nosocomiales. Il s'agit souvent de bactéries facultativement pathogènes comme *staphylococcus aureus*. Mais on trouve plus souvent des bactéries opportunistes : *entérobactéries*, *staphylococcus epidermidis*, *psodomonas aeruginosa.*, *stenotrophomonas maltophilia.*, *burkholderia cepacia* , *acinetobacter*, *entérocoque*, etc, qui présentent fréquemment une résistante vis-à-vis de

nombreux antibiotiques. Elles sont implantées dans les hôpitaux comme « flore hospitalière ». Le type de résistance de ces bactéries reflète, pour les différents hôpitaux (**kayser et al., 2008 ; Nauciel et vildé, 2005**).

- **Virus**

Les virus sont aussi des agents d'infections nosocomiales : le VIH agent du sida ,le virus des hépatites B et C ,tout transmis par le sang ; les virus donnant des atteintes respiratoires : virus grippal; VRS (virus respiratoire syncytial) actif chez les jeunes enfants ; coronavirus humain, un des agents du rhume; métapneumovirus humain, un des agents de la broncho-alvéolite du nourrisson ; un autre coronavirus, donnant des pneumopathies sévères (SRAS), virus agents de gastro-entérites (rotavirus chez l'enfant, norovirus à tous les âges) et d'autres (adénovirus et conjonctivite) (**Briand, 2012**).

- **Champignons**

Les infections nosocomiales à champignons ont augmenté au cours de ces dernières années. Elles apparaissent fréquemment chez les patients immunodéprimés (**kayser et al., 2008**).

II. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise.

1. Types de résistance

1.1 . 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. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des entérobactéries et du *Pseudomonas* aux macrolides ou des bactéries à gram négatif à la vancomycine est naturelle. La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique.

La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire (**Thiriet, 2010**).

1.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable (**Thiriet, 2010**).

2. Mécanismes de la résistance

2.1. Inhibition enzymatique

Le micro-organisme produit une enzyme qui détruit ou inactive l'antibiotique. La production enzymatique peut être induite par un facteur externe (un autre antibiotique) ou constante (non affectée par stimuli externes). On appelle inductible une résistance qui se produit à la suite d'une exposition à un agent d'une classe pharmacologique donnée et constitutive lorsque les gènes à l'origine de la résistance s'expriment en permanence, même en l'absence de tout antibiotique (**Carle, 2009**).

2.2. Altération de la cible

Cette modification a pour effet de diminuer l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, compte du caractère essentiel des fonctions cibles des antibiotiques, la modification de la cible se doit de conserver un phénotype viable à l'organisme (**Paolozzi et Liébart, 2015**).

La résistance aux β -lactames s'obtient par mutation des PBP (protéine liant la pénicilline). Leur conférant une affinité diminuée pour l'antibiotique. La résistance à la vancomycine, qui agit sur l'incorporation des résidus D-ala-D-lac. Dans les précurseurs du peptidoglycane s'obtient par remplacement de ce peptide par du D-ala-D-lac (**Paolozzi et Liébart, 2015**).

Dans le cas des antibiotiques affectant la synthèse protéique, les mutations conférant la résistance aux macrolides affectent l'ARN 23S de la sous-unité 50S : celles concernant les aminoglycosides affectent l'ARN 16S de la sous-unité la transcription (tel la rifampicine). Les mutants résistants résultent d'une mutation du gène *rpoB*, codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (**Paolozzi et Liébart, 2015**).

La cible classique des antibiotiques affectant la synthèse de l'ADN est la gyrase, constituée de deux sous-unité, GyrB, sensible à certaines dérivés de la coumarine tels la novobiocine, et

GyrA, sensible aux fluoroquinolones telles la ciprofloxacine. Les résistances sont dues à des mutations affectant la sous-unité correspondante de l'ADN gyrase (**Paolozzi et Liébart, 2015**).

2. 3. Pompes (transporteurs) à efflux

L'antibiotique ne peut pas atteindre son site d'action par pompage actif de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie (efflux). Les transporteurs d'efflux de plusieurs médicaments sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens. Ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition aux antibiotiques favorise une surexpression par mutation de transporteurs, entraînant une hausse de la résistance bactérienne. Il est également possible qu'une résistance par efflux apparaisse à cause de l'exposition à un antibiotique d'une autre classe. Ainsi, on sait que la ciprofloxacine peut favoriser l'émergence d'une résistance à la céphalosporine par la voie de ce mécanisme. Parmi les bactéries d'importance clinique munies d'une pompe à efflux comme mécanisme de résistance, on trouve l'*Escherichia coli* et le *Shigella*, le *Staphylococcus aureus* peut également comporter une pompe à efflux lui permettant d'acquérir une résistance aux macrolides (**Carle, 2009**).

III. Support génétique de la résistance

1. Plasmides

1.1. Définition

Le terme plasmide fut introduit par biologiste moléculaire américain Joshua Lederberg en 1952.

Les plasmides sont des fragments d'ADN bicaténaire extrachromosomique de taille variable (1 pour 1000 à 1 pour 100 de la taille du chromosome). Caractérisés par leur structure circulaire surenroulée, peuvent être plusieurs mais différents dans une même bactérie. Avec une taille différente ($3 \cdot 10^6$ à $4,5 \cdot 10^6$ pb), et répliqués de façon autonome, localisés dans le cytoplasme (**Boulahbal, 2002**).

Les plasmides de grande taille sont présents en règle générale dans la cellule sous forme d'une à deux copies, et les petites tailles sous 10 à 100 copies. Les plasmides ne contiennent pas d'éléments essentiels pour la survie de la bactérie, beaucoup des plasmides portent des gènes codant pour des propriétés phénotypiques de leur cellule hôte (**kayser et al., 2008**).

1.2. Réplication de plasmide

La réplication de l'ADN plasmidique fait largement appel à l'équipement enzymatique de la bactérie hôte. 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 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 (**Yassine, 2015**).

1.3. Classifications des plasmides

- **Groupes d'incompatibilités**

Le phénomène d'incompatibilité des plasmides est lié à la régulation du nombre de copies des plasmides et à leur ségrégation. Un groupe d'incompatibilité est défini comme un ensemble de plasmides dans les membres sont incapables de coexister dans la même cellule bactérienne. La raison de cette incompatibilité est qu'un ne peut les différencier les uns des autres à des étapes essentielles au maintien du plasmide. Comme la réplication de l'ADN ou la ségrégation. Dans le modèle du contrôle négatif de l'incompatibilité des plasmides, on suppose que le contrôle du nombre de copies est assuré par la synthèse d'un répresseur qui mesure la concentration de l'origine de réplication (c'est en fait le même modèle que celui de la titration pour la régulation de la réplication du chromosome bactérien). L'introduction de nouvelle origine sous la forme d'un deuxième plasmide du même groupe de compatibilité reproduit le résultat de la réplication du plasmide de résident deux origines sont maintenant présentés, donc toute réplication ultérieure est deux plasmides dans des cellules différentes pour retrouver le nombre de copies correct avant l'étape de réplication (Figure 1) (**Benjamin, 1999**).

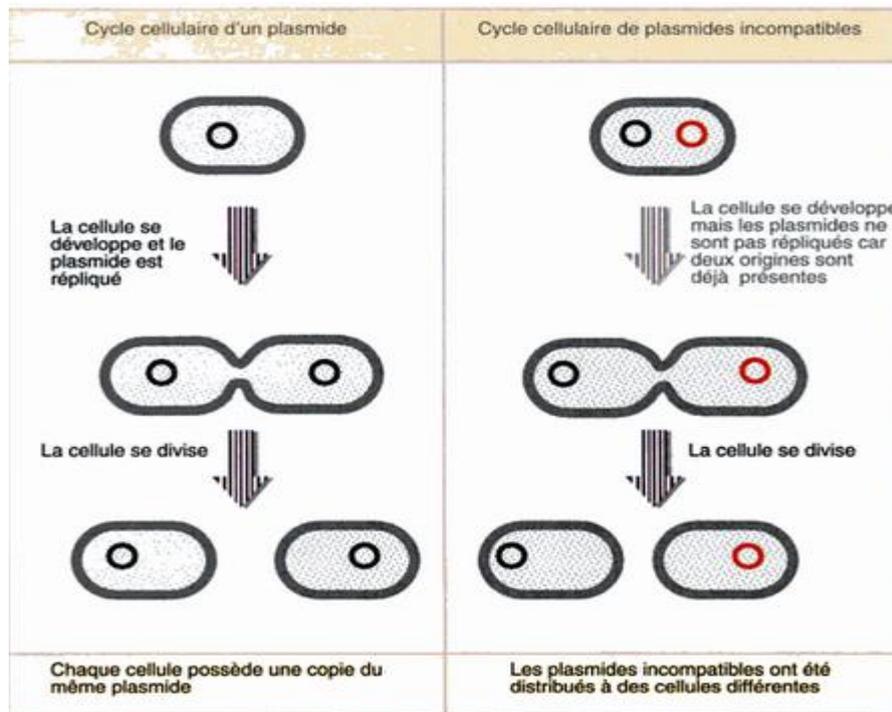


Figure 1: l'incompatibilité du plasmide (Benjamin, 1999).

- **Facteur F**

Le plasmide F chez *Escherichia coli* est le premier plasmide découvert par Hayes qui commande les gènes *tra* (figure 2) qui sont responsables de la formation des pilis sexuels des cellules F et de la procédure de transfert (Gaudriault et Vincent, 2009). Le transfert du plasmide conjugatif par les étapes de conjugaison bactérienne grâce à des gènes occasionnelle du facteur F dans le chromosome, celui-ci acquiert des propriétés de conjugaison de ce facteur. Du fait de cette intégration constituée un élément conjugatif géant qui, par le même mécanisme, permet le transfert des gènes chromosomique. les cellules qui possèdent un facteur F intègrent pour cette raison, dénommées cellules HFR (Tableau 1) (Kayser *et al.*,2008).

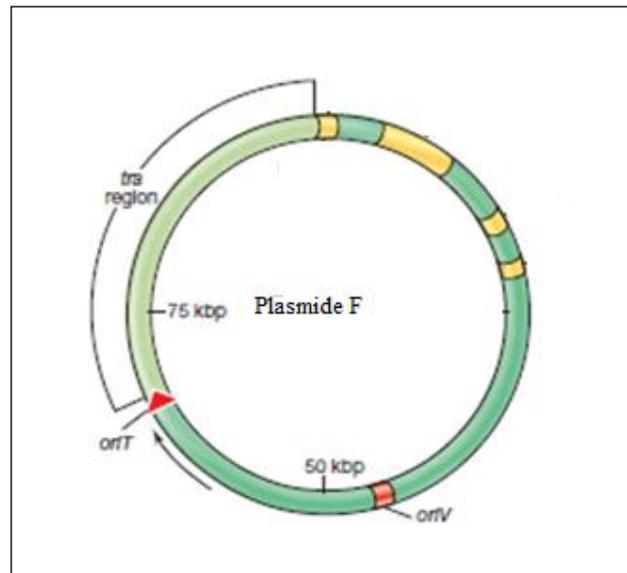


Figure 2: la structure de plasmide F (Madigan *et al.*, 2012).

- **Facteur R**

Le premier plasmide baptisé RTF (résistance transfer factor) puis R. conférant la résistance à plusieurs antibiotique, a été isolé au début des années 1960, à partir d'une souche de *shigella multirésistante*; sa structure révèle deux régions bien distinctes: l'une impliquée dans le transfert conjugatif du plasmide, l'autre, conférant la résistance aux antibiotique (figure 3), il s'avéré transférable aussi bien aux bactéries Gram- qu'aux bactéries Gram+. Il a pu être caractérisé chez des souches issues de collections réalisées au début des années 1930, c'est à dire dans la période pré thérapie par antibiotique (Paolozzi et Liébarta, 2015).

Ce plasmide a été le premier d'une longue série de plasmides un phénotype de résistance multiple aux antibiotiques, dits à large spectre d'hôtes, et pouvant donc se maintenir et s'exprimer de façon stable dans de nombreuses espèces bactériennes tant Gram+ que Gram- (Tableau 1) (Paolozzi et Liébarta, 2015).

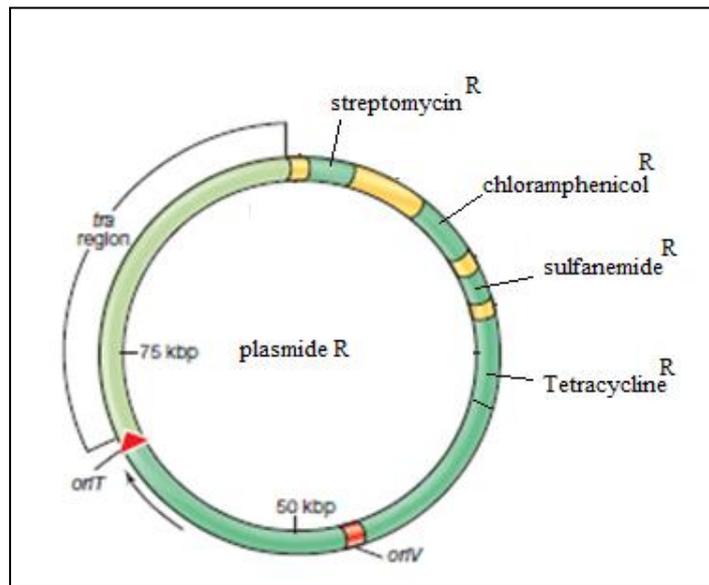


Figure 3 : plasmide multi résistance (plasmide R) (Madigan *et al.*, 2012).

- **Facteur métabolique**

Codent pour la Fermentation de certaine sucres, et l'utilisation de certains acides aminée (Boulahbal, 2002). Permettent la transformation d'éléments inhabituels du milieu extérieur comme des solvants organiques (toluène, xylène, octane) ou l'acide salicylique (Tableau 1) (Carip, 2008).

- **Facteur de virulence**

Ces plasmides sont responsables de la transmission de caractères pathogènes comme par exemple pour les *Escherichia coli* entérotoxigènes (Tableau 1) (Carip, 2008).

- **Facteur Colicinogène**

Le facteur col est un plasmide codant pour la synthèse de colicines (substances élaborées par la bactérie et douées d'un effet létal sur certaines bactéries) (Tableau1) (Boulahbal, 2002).

Tableau 1 : Principaux types de plasmides (Meyer *et al.*,2010).

Types	Exemple	Taille approximative (Kb)	Hôtes
Facteur de fertilité	Facteur F	95-100	<i>Escherichia coli</i> <i>citrobacter</i>
Plasmides R	RP ₄	54	<i>Pseudomonase</i>
	R ₁	80	<i>Gram⁻</i>
	pSH ₆	21	<i>Staphylocoque aureus</i>
Plasmides col	col E ₁	9	<i>E.coli</i>
	col E ₂		<i>Shigella</i>
Plasmides de virulence	Ent (p307)	83	<i>E.coli</i>
	Col V-K ₃₀	2	<i>E.coli</i>
Plasmides métaboliques	pZa 10	56	<i>Staphylocoque aureus</i>
	CAM	230	<i>Pseudomonase</i>
	SAL	56	<i>Pseudomonase</i>
	TOL	75	<i>p.putida</i>

2. Intégrons

2.1. Définition

Les intégrons sont des éléments génétiques retrouvés exclusivement chez les bactéries ils constituent un système naturel de capture, d'expression et de dissémination des transposons. C'est donc une structure qui permet à des gènes de s'intégrer et de s'exprimer. Les intégrons sont définis comme l'association entre : un gène *intI* codant une protéine appelée intégrase. Cette enzyme appartient à la famille des recombinases spécifique de site, elle catalyse l'insertion et l'excision de gènes contenus dans des éléments nommés cassettes de gènes un site attI, adjacent au gène intI, il contient le point d'insertion des gènes de cassettes Un

promoteur P_c , orienté dans le sens inverse du gène de l'intégrase, qui permet la transcription des gènes de cassettes (figure 4). L'ensemble de ces trois éléments constitue une région bien conservée en 5', commune à tous les intégrons. Dans la très grande majorité des cas, elle est suivie en 3' d'un réseau de cassettes en tandem orientés dans le sens inverse du gène *intI* cette partie en 3' est variable d'un intégron à un autre (Ploy et Denis, 2000).

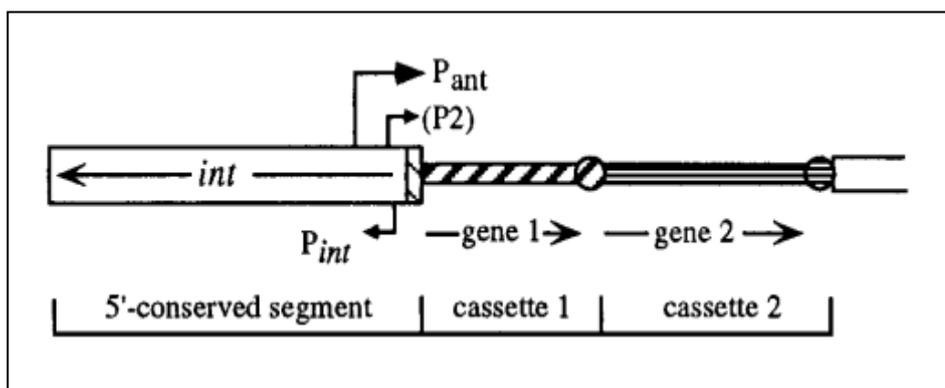


Figure 4 : structure d'intégrons (Collis et Hall, 1994).

2.2. Types de l'intégrons

On distingue deux grands types d'intégrons:

- **Les intégrons de multirésistance (IM)** : sont portés par des plasmides et/ou des transposons; ils sont connus pour leur rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques (Boudjemaa, 2015).

- **Les super-intégrons (SI)** : sont strictement chromosomiques et jouent un rôle plus large en tant que réservoir de gènes à haute valeur adaptative.

Des dizaines de classes d'intégrons ont été définies sur la base de la séquence de leurs intégrases *IntI*. La majorité des classes correspondent à des super-intégrons et cinq à des intégrons de multirésistance. Les IM 1 à 3 sont les classes d'intégrons les plus prévalentes en microbiologie clinique et les mieux caractérisées (Boudjemaa, 2015).

2.3. Cassettes

2.3.1. Définition

Les cassettes de gènes sont des éléments mobiles non-réplicatifs qui existent sous une forme libre circulaire et sous forme linéaire, intégrée au sein d'un intégron le plus souvent. Elles sont constituées d'une (ou plus rarement, de plusieurs) séquence codante et d'un site de recombinaison *attC*. Les fonctions des gènes portés par les cassettes correspondent à des résistances vis-à-vis de molécules antimicrobiennes (antibiotique, antiseptiques) et plus généralement de gènes à haute valeur adaptative. En revanche, les gènes de ces cassettes sont dépourvus de promoteur (**Belouni *et al.*, 2009**).

2.3.2. Structure des cassettes

les cassettes possèdent une organisation commune (figure 5). Elles contiennent un gène flanqué son extrémité 3' d'une séquence palindromique, le site *attC*. Il s'agit d'un site spécifique de recombinaison reconnu par l'intégrase, et souvent désigné «élément 59pb » car les premiers sites *attC* décrits avaient une taille de 59pb. Il est constitué de plusieurs séquences relativement conservées, inversées et répétées, capables de réaliser une structure cruciforme. En fait, les séquences conservées recouvrent surtout les 20 premières et les 20 dernières bases, et encadrent une région de séquence et de longueur variables. Ainsi, certains sites *attC* sont formés de 141 paires de bases, d'où l'ambiguïté de la terminologie « élément 59-pb ». On trouve aux deux extrémités de chaque site *attC* deux séquences inversées et répétées de 7 paires de bases désignées core et core inverse. Le core (GTTRRRY; R: purine ; Y: pyrimidine) est localisé à l'extrémité 3' du site *attC* et le core inverse, de séquence complémentaire RYYAAC, à l'extrémité 5' (**Ploy et Denis, 2000**).

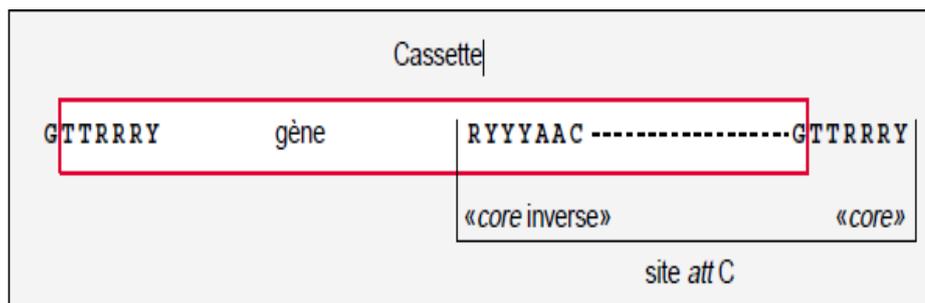


Figure 5 : structure de cassette (Ploy et Denis, 2000).

2.4. Mécanisme de l'intégration

Les cassettes sont intégrées seules ou en tandem entre les deux régions conservées de l'intégron. Lorsqu'elles sont intégrées, les cassettes sont sous forme linéaire, mais elles peuvent aussi exister sous forme libre, circulaire, après leur excision (figure 6). L'intégrase IntI1 catalyse en effet aussi bien l'intégration que l'excision des cassettes, ces mouvements (qui ne font pas intervenir la protéine RecA) s'effectuant par recombinaison entre deux sites spécifiques reconnus par l'intégrase. Il s'agit des sites attC situés à l'extrémité 3' de chaque cassette, mais aussi d'un autre site, le site attI, localisé à la jonction de la région 5' conservée de l'intégron et de la première cassette (figure 6). Les événements de recombinaison peuvent impliquer 2 sites attC ou un site attC et un site attI. L'intégration des cassettes se fait préférentiellement par recombinaison entre le site attI de l'intégron et le site attC de la cassette, tandis que leur excision se fait plutôt par recombinaison entre deux sites attC. Le site attI contient la même séquence core, GTTRRRY, que le site attC mais ne contient pas de séquence complémentaire RYYYAAC (core inverse) ni de séquence inversée et répétée. Les sites attI des trois classes d'intégrons sont très différents hormis la séquence GTTRRRY et la présence de nombreuses bases A localisées dans la région 5'. L'activité de ce site ne semble donc pas liée à une séquence particulière ni à une structure secondaire, contrairement aux sites de recombinaison habituellement reconnus par les intégrases dont les sites attC. Cependant, une région minimale de 33 paires de bases paraît nécessaire à l'activité du site attI des intégrons de classe I. Exceptionnellement, l'événement de recombinaison peut impliquer un site spécifique et un site non spécifique, appelé site secondaire dont la séquence, généralement GWTMW (W:T/A; M:A/C), est semblable à celle du core GTTRRRY. L'intégration est alors stable car l'excision d'une cassette au niveau d'un site secondaire est peu probable (Ploy et Denis, 2000).

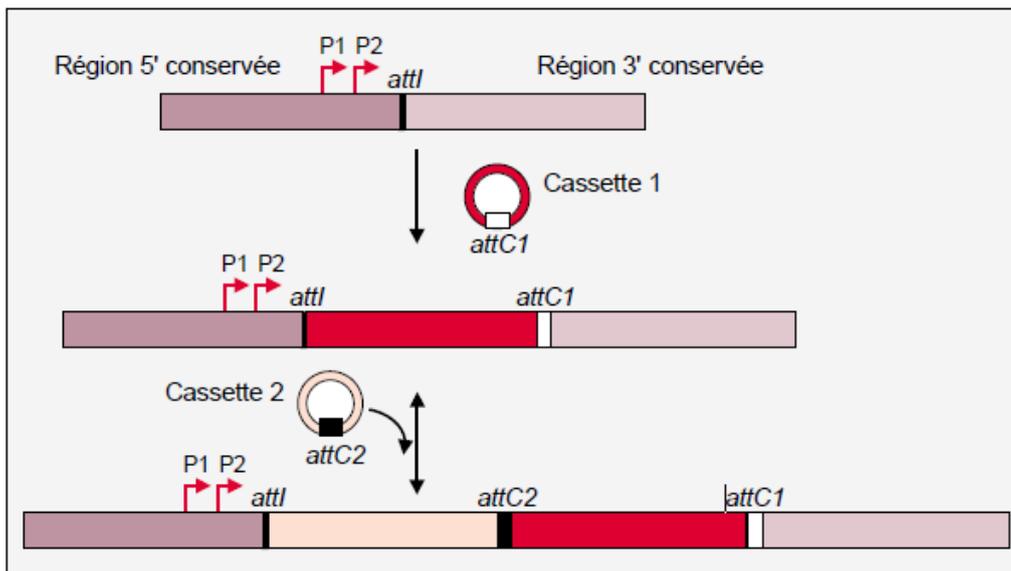


Figure 6 : Intégration des cassettes dans un intégrons (Ploy et Denis, 2000).

3. Transposons

3.1. Définition

Les éléments transposables ou transposons constituent une autre discrète du génome qui sont mobiles capables de se transporter elles-mêmes à d'autres endroits du génome. La caractéristique d'un transposon est de ne pas utiliser une forme indépendante de l'élément (comme un ADN phagique ou plasmidique), mais ces éléments peuvent, donc, se transférer d'une localisation chromosomique à une autre, d'un chromosome à un plasmide (Priour *et al.*, 2015).

3.2. Types des transposons

3.2.1. Séquences d'insertion (IS)

Les IS sont les éléments transposables les plus simples. Elles ne contiennent que les informations génétiques nécessaires à leur transposition et sont donc considérées comme phénotypiquement cryptiques. De petite taille (généralement inférieure à 2 500 pb), elles sont le plus souvent bordées par des séquences IR (inversement répétées) de 20 à 40 pb qui sont reconnues par la machinerie de transposition. Plus de 500 IS ont été identifiées dans 73 genres incluant 159 espèces d'eubactéries et d'archaeobactéries. Elles ont été détectées sur tous les

chromosomes procaryotes partiellement ou complètement séquencés et sur de nombreux plasmides et bactériophages. Seul le chromosome séquencé de *Bacillus subtilis* n'a révélé aucune IS, sans qu'on sache s'il s'agit d'un cas particulier inhérent à la souche utilisée ou d'une caractéristique générale de l'espèce (figure 7a) (**Merlin et Toussaint, 1999**).

3.2.2. Transposons composites

Les transposons composites contiennent différents gènes situés entre deux éléments IS quasiment identiques orientés en sens inverse (figure 7b) et qui de ce fait, forment une répétition inversée. La transposase pour catalyser le déplacement du transposon entier. Tn10 est un exemple de transposon composite ;Tn10 porte un gène qui confère la résistance à l'antibiotique tétracycline et est flanqué de deux éléments IS10 orientés en sens inverse. Les éléments IS appartenant aux transposons composites sont incapables de se transposer seuls en raison des mutations qu'ils portent dans leurs répétitions inversées (**Vivcent, 2007**).

3.2.3. Transposons non composites (Tn3)

Les transposons non composites n'ont pas d'IS à leurs extrémités mais deux séquences terminales IR (de 35 à 48 Pb) nécessaires à la reconnaissance par la transposase. leur mode de transposition implique une transposase (TnpA) mais également une autre enzyme , la résolvasse (TnpR) qui permettra de terminer la réaction en catalysant une étape de recombinaison à un site spécifique (res) porté par le transposon (résolution de coïntégrat) . Leur transposition est répllicative et conduit à une duplication de 5 Pb du site cible .En plus des protéines essentielles à leur dissémination, ces transposons codent des gènes de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds (figure 7c) (**Prieur et al., 2015**).

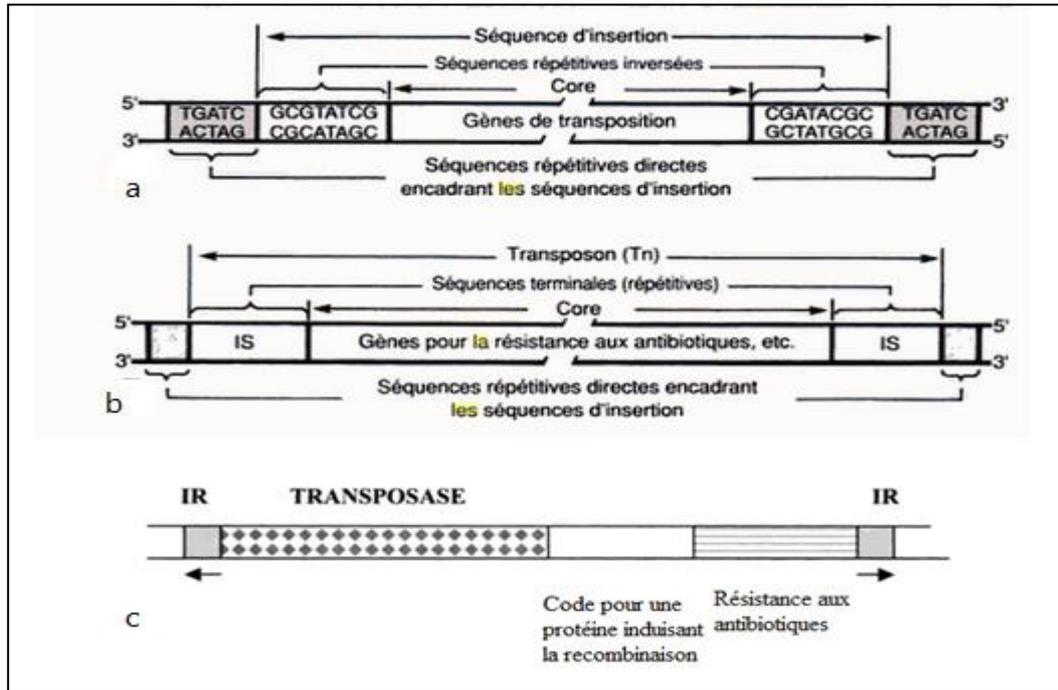


Figure 7: structure des transposons, a : séquence d'insertion, b : transposon (Tn), c : transposon non composite (schaehter *et al.*, 1999).

3.2.4. Transposons conjugatifs

Les transposons conjugatifs portent des gènes impliqués dans la coupure et l'échange de brins d'ADN, la conjugaison (*tra*) et des marqueurs de résistance (antibiotique par exemple). La première étape de la transposition (l'excision) conduit à la circularisation de l'élément ,et est contrôlée par une intégrase (*Int* –Tn) et parfois une excisionase (*Xis* – Tn) . L'originalité de ces transposons et qui ils sont capables de se propager « verticalement » mais également « horizontalement » par conjugaison .Ils sont donc très souvent associés aux phénomènes de propagation des résistances aux antibiotiques (Prieur *et al.*, 2015).

4. Mécanisme de transposition

4.1. Transposition conservative

La transposition conservative implique que l'élément transposable quitte le réplicon donneur pour se réinsérer au site cible. Le départ du transposon laisse une brèche dans le réplicon donneur qui, de ce fait, sera perdu à moins qu'une autre copie du réplicon ne soit présente dans la cellule hôte et ne puisse servir de réplicon modèle pour une conversion génique. Celle-ci permettra alors de réparer la brèche à partir de la copie du transposon présente sur le

réplicon modèle. Après transposition et réparation, il y aura donc deux copies du transposon dans la cellule, l'une dans le réplikon donneur, l'autre dans le réplikon cible (figure 8) (Merline et Tousaint, 1999).

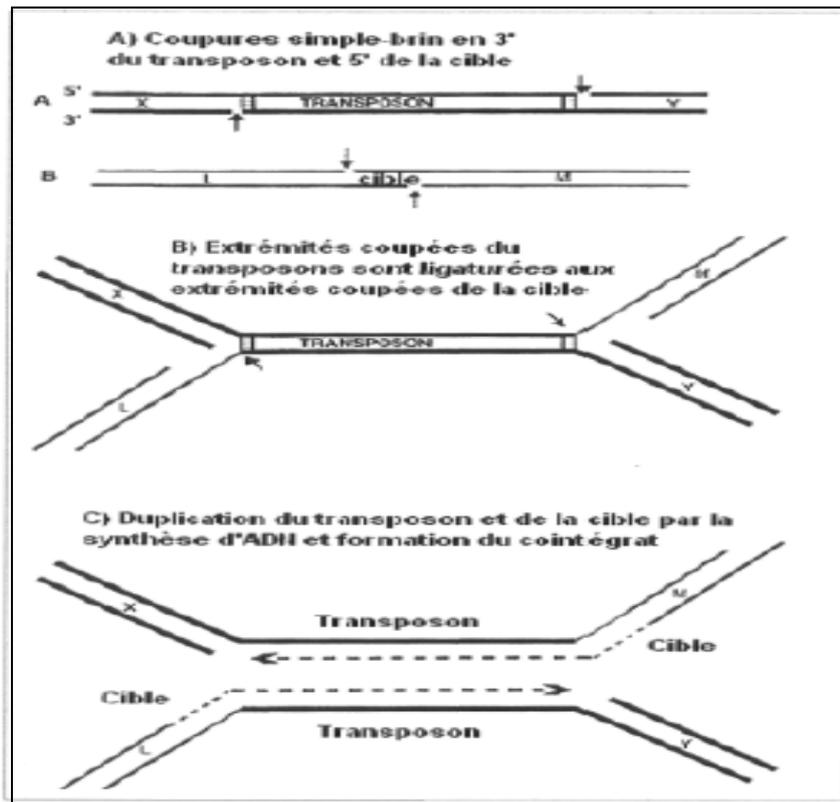


Figure 8 : la transposition conservative (Dale et Park, 2004).

4.2. Transposition rélicative

Dans La transposition rélicative le transposon original reste au site parental sur le chromosome et une réplique s'insère dans l'ADN au site cible (figure 9). La transposition du transposon Tn3 est un exemple bien étudié de transposition rélicative. Au premier stade, l'ADN contenant Tn3 fusionne avec l'ADN cible pour former une molécule Co-intégrée. Ce processus requiert la transposase de Tn3 codée par le gène *tnpA* notez que le Co- intégrât contient deux copies du transposon Tn3 au second stade, le co-intégrat est résolu pour donner deux molécules d'ADN, avec chacune une copie du transposon. la résolution implique un enjambement et est catalysée par une résolvasse, codée par le gène *tnpR* (Prescott *et al.*, 2010).

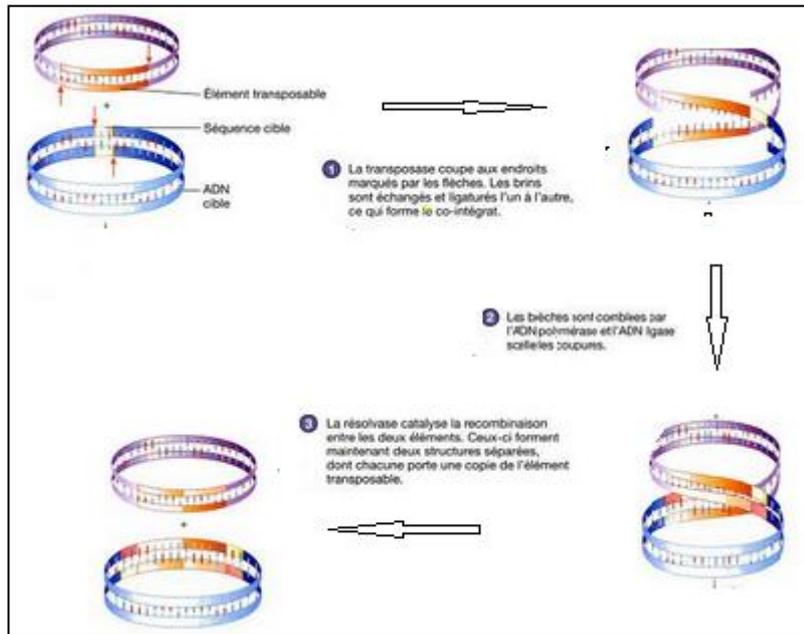


Figure 9 : la transposition rélicative (Prescott *et al.*, 2010).

Chapitre 2 :

Le transfert génétique

I. Transformation

1. Généralité

Découvert par Griffith en 1928. Le phénomène de transformation n'a été compris qu'en 1944 à la suite des expériences d'Avery, Macleod et MacCarthy (figure10). Démontrent, après une analyse systématique in vitro, que la substance responsable de la transformation n'est autre que l'acide désoxyribonucléique (**Figarella et Calas, 2001**).

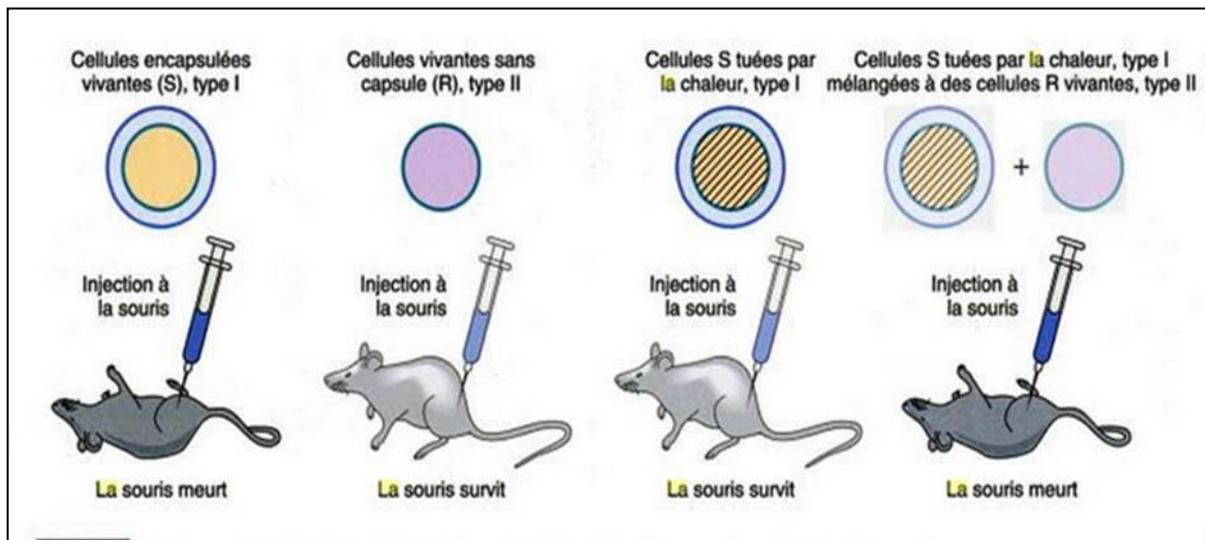


Figure 10 : La découverte de la transformation bactérienne (**Karp, 2010**).

1. Définition :

Certaines bactéries peuvent capter des fragments d'ADN à partir du milieu extérieur. Ceci est un autre moyen pour les bactéries d'échanger leur gènes. L'ADN peut provenir d'autres cellules de la même espèce ou de cellules d'autres espèces. Dans certains cas, l'ADN est issu de cellules mortes. Dans d'autres cas, L'ADN a été sécrété hors de cellules bactériennes vivantes. L'ADN capté s'intègre dans le chromosome du receveur. si cet ADN provient d'un génome différent de celui du receveur, le génotype du receveur peut être changé durablement au cours d'un processus appelé transformation (**Thomas, 2016**).

2. Etat de compétence

La compétence est un état physiologique transitoire (sauf exception comme chez *Neisseria gonorrhoeae*) génétiquement contrôlé, que de nombreux procaryotes développent de façon naturelle, et que l'on sait induire artificiellement en laboratoire. La compétence naturelle a été étudiée dans les conditions de laboratoire, et chez peu d'organismes, essentiellement deux bactéries modèles, Gram+, ce qui a longtemps maintenu l'idée que seul ce groupe de bactéries en était capable : *Streptococcus pneumoniae* et *Bacillus subtilis*. Le développement de la compétence exige la synthèse de 25 à 50 protéines différentes, qui sont produites en réponse à des stimuli externes comme les changements des conditions de croissance, de l'accessibilité aux nutriments, c'est-à-dire de condition de carences, et de la densité de la population cellulaire **(Paolozzi et Liébart, 2015)**.

Chez *Streptococcus pneumoniae*, le développement de la compétence se manifeste dès que la population atteint une certaine densité et quand le pH intercellulaire est de l'ordre de 8,3. Dans les conditions de laboratoire, la compétence est un état transitoire (une trentaine de minutes environ équivalent à un temps de génération), contrairement à d'autres espèces pour lesquelles la compétence se poursuit bien au-delà du temps de doublement. Chez *Bacillus subtilis*, la compétence se développe à la fin de la croissance exponentielle de la population et à la suite d'un stress nutritionnel prolongé. Pour d'autres bactéries comme *Haemophilus influenzae*, le signal déclencheur est inconnu ; ce processus exige une carence nutritionnelle et la présence d'adénosine-monophosphate cyclique (AMPC). La proportion de cellules qui deviennent compétentes au sein d'une population est très variable selon les espèces, et comprise entre une fraction et 100% **(Paolozzi et Liébart, 2015)**.

La physiologie de l'état de compétence, et sa régulation complexe, font intervenir des systèmes de réponse aux signaux externes et des interactions intercellulaires. ainsi l'état de compétence peut-être associé, au moins chez les bactéries du genre *Streptococcus*, à un comportement fratricide, une stratégie qui conduit les cellules compétentes à tuer les cellules non compétentes pour en libérer l'ADN **(Paolozzi et Liébart, 2015)**.

Certaines espèces naturellement non transformables peuvent être poussées à devenir compétentes. Par exemple, *Escherichia coli*, en utilisant des traitements chimiques par le CaCl₂, glacé suivis d'une courte période de choc thermique. Cette compétence n'est pas identique à la compétence naturelle **(Nicklin et al., 2000)**.

3. ADN transformant

L'aptitude à la transformation est étroitement conditionnée par la taille des fragments de chromosome de la bactérie donatrice. Avec le *pneumocoque*, la masse molaire moyenne des préparations d'ADN actif est de 5×10^6 daltons. Chaque molécule de préparation transformant représente environ la 300^e partie du génome d'une bactérie. La probabilité de transformation doit donc augmenter en fonction de la concentration en ADN. L'ADN doit être bicaténaire. En général, un seul caractère est transféré au cours du phénomène, même si les bactéries donatrices et réceptrice diffèrent par de nombreuses autres propriétés (**Figarella et Calas, 2001**).

4. Absorption et la sort de l'ADN

La nature de l'ADN prise dépend du genre. La plupart des bactéries vont absorber toute molécule d'ADN, l'*Haemophilus* requiert la présence d'une séquence spécifique de 10 Kb sur l'ADN. L'*Haemophilus*, bactérie Gram négative, lie et absorbe ADN double brins, contrairement aux bactéries Gram positives, *Bacillus* et *Streptocoque*, qui lient l'ADN double brins et qui dégradent un brin alors que l'autre brin est emporté dans la cellule. L'ADN linéaire entrant est protégé contre la dégradation par des protéines de compétence-spécifique et est intégré dans le génome par recombinaison grâce à l'action de la protéine RecA. Après induction artificielle d'une compétence chez *Escherichia coli*, des ADN plasmidiques circulaires sont préférentiellement absorbés et restent indépendants dans le chromosome (figure 11) (**Nicklin et al., 2000**).

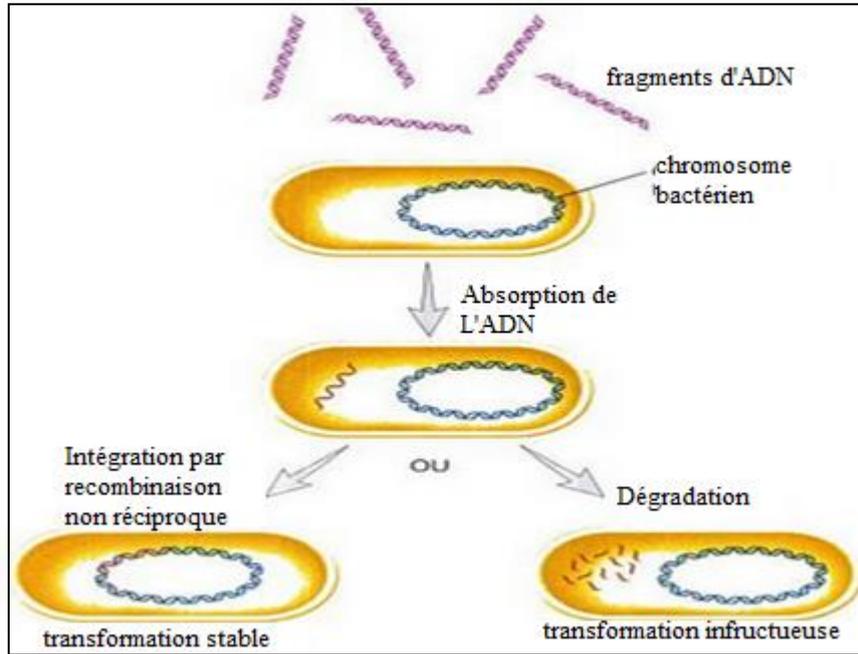


Figure 11 : la transformation par l'ADN (Moussard, 2005).

II. Conjugaison

1. Généralité

Lederberg et tatum mélangèrent deux souches autotrophes, incubèrent la culture pendant plusieurs heures dans un milieu nutritif et l'étalèrent sur un milieu minimum. Afin de réduire le risque que leurs résultats soient dus à une simple réversion, ils employèrent des doubles et triples auxotrophes, considérant que deux ou trois réversions simultanées seraient extrêmement rares. Par exemple, une souche exigeait de la biotine (Bio^-), de la phénylalanine (phe^-) et de la cystéine (cys^-) pour sa croissance, et une autre souche exigeait des colonies recombinantes prototrophes apparurent sur le milieu minimum après incubation (Figure12). les chromosomes des deux souches auxotrophes étaient donc capables de s'associer et se recombiner (Prescotti *et al.*,2010).

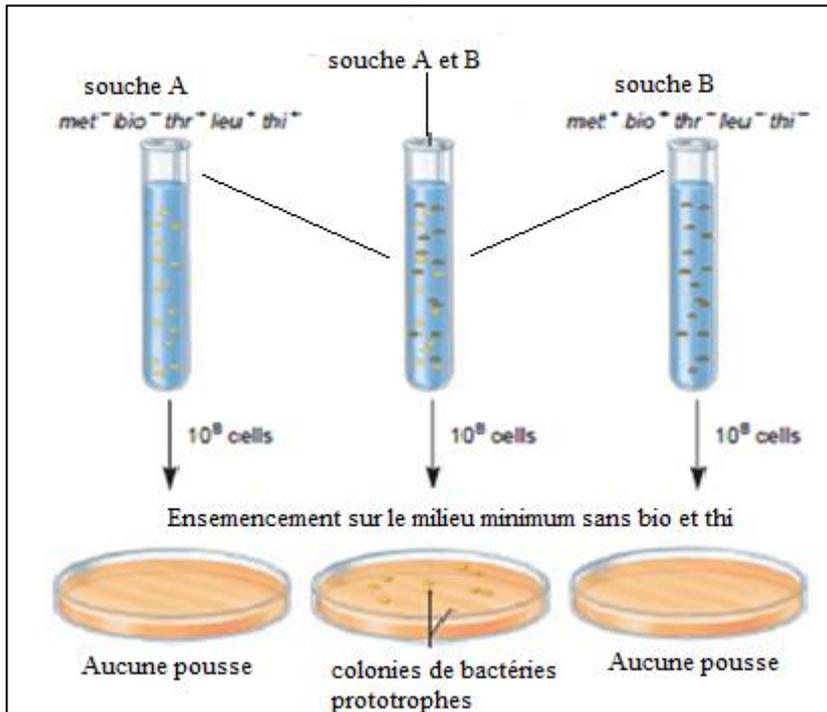


Figure 12 : la preuve de la conjugaison bactérienne (Brooker, 2012).

Lederberg et tatum n'avaient pas directement prouvé que le contact physique des cellules était nécessaire pour le transfert de gènes. Ceci fut démontré par Bernard Davis (1950) qui construisit un tube en U, fait de deux tubes de verre condés soudés à la base pour le U, avec un verre filtré entre les deux moitiés. Le filtre permet le passage du milieu nutritifs et inocula chaque branche avec une souche auxotrophe différente d'*Escherichia coli* (figure 13). Au cours de l'incubation, le milieu fut pompé en aller-retour, à plusieurs reprises, à travers le filtre pour s'assurer qu'il y avait échange du milieu liquide entre les deux du tube. Après 4 heures d'incubation, les bactéries furent étalées sur milieu minimum. Davis constata que lorsque les deux souches auxotrophe étaient séparées l'une de l'autre par le mince filtre, le transfert de gènes ne pouvait avoir lieu. par conséquent, un contact direct était requis pour la recombinaison que lederberg (Prescott *et al.*,2010).

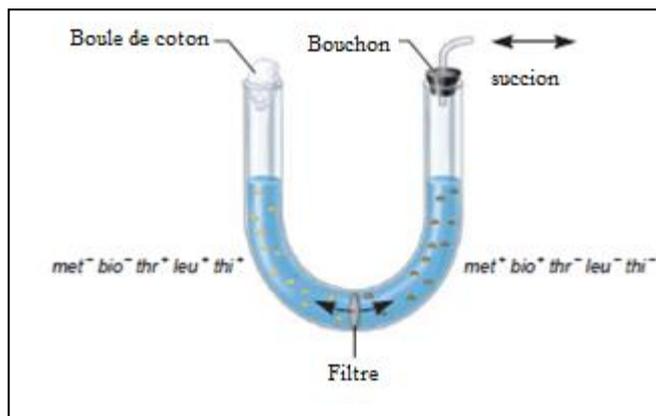


Figure 13 : l'expérience du tube en U (Brooker, 2012).

2. Définition

La conjugaison est le transfert de matériel génétique d'une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice par contact direct entre les deux bactéries. Le matériel génétique transféré peut être chromosomique ou extra-chromosomique (plasmide) ou transposon conjugatif (Boulahbal,2002).

3. Les modes de transfert par conjugaison chez les Gram⁻

- Croisement F⁺ × F⁻

Au cours d'un croisement F⁺ × F⁻ ou conjugaison. Facteur F se réplique par un mécanisme de cercle roulant et une copie migre vers la cellule receveuse. La chaîne en voie de pénétration est copiée pour donner un ADN double brin. La fréquence de recombinaison des gènes chromosomique est faible parce que chromosome bactérien est rarement transféré avec le facteur F indépendant. On ne comprend pas toujours bien comment le plasmide passe d'une bactérie à l'autre. Le pilus sexuel ou pilus F unit le donneur et le receveur et peut se contracter pour les rapprocher. Le canal de transfert d'ADN pourrait être le pilus F creux ou un tube de conjugaison particulier formé lors du contact (figure 14a) (Prescott *et al.*,2007).

- Conjugaison Hfr

Dans ce type de conjugaison le donneur transfère des gènes chromosomiques avec une grande efficacité, mais ne transforme pas les bactéries receveuses en cellules F⁺ à cause a la haute fréquence de recombinants produits par ce croisement, on parle de conjugaison Hfr bien

Chapitre 2 : le transfert génétique

qu'initialement on ne connut pas le mécanisme de la conjugaison Hfr, on finit par établir que les souches Hfr contenaient le facteur F intégré dans leur chromosome, plutôt que libre dans le cytoplasme.

Le transfert de l'ADN commence par la coupure du facteur F intégré, à son site d'origine de transfert. Tout en se répliquant, le chromosome migre vers le receveur. Comme le facteur F n'est transféré qu'en partie, le receveur F^- ne deviendra pas F^+ , sauf si le chromosome est transféré en entier (figure 14b), (**Prescott *et al.*,2010**).

- **Croisement $F^+ \times F'$**

Le plasmide F étant un épisome, il peut quitter le chromosome bactérien. Durant ce processus le plasmide fait parfois des erreurs d'excision et emporte une portion du matériel chromosomique pour former un plasmide F^+ . Il n'est pas plasmide F excisés. La cellule F' conserve tous ses gènes. Certains sont portés par le plasmide, et ne peut effectuer un croisement qu'avec une receveuse. La conjugaison $F' \times F^+$ est essentiellement identique au croisement $F^+ \times F^+$ sont transférés avec celui-ci et ne doivent pas être incorporés dans le chromosome de la cellule receveuse afin d'être exprimés. la receveuse devient F' (figure 14c) (**Prescott *et al.*,2007**).

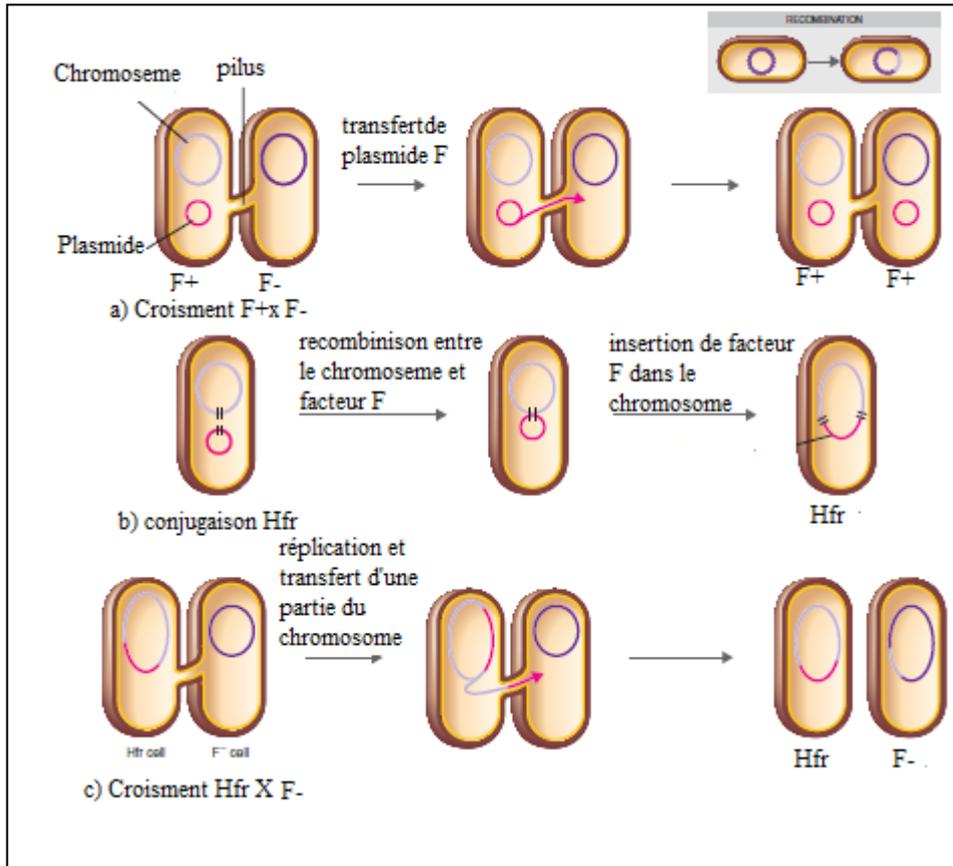


Figure 14: le transfert par la conjugaison (Tortora *et al.*,2013).

4. Conjugaison chez les bactéries Gram +

Il existe des plasmides auto transmissibles chez des genres bactériens Gram-positifs, comme *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Etraphylococcus* et *Streptomyces*. Ces systèmes sont beaucoup moins bien connus. Il apparaît que moins de gènes de transfert y sont impliqués, peut-être parce que le transfert de ces plasmides ne semble pas exiger de pilus sexuel. Par exemple, les cellules receveuses d'*Enterococcus hirae* libèrent de courts peptides servant de signaux chimiques, qui activent les gènes de transfert des cellules donneuses qui contiennent le plasmide adéquat. Cellules donneuses et receveuses adhèrent l'une à l'autre directement, par l'intermédiaire de protéines spéciales codées par le plasmide et relâchées par la cellule donneuse activée, le transfert du plasmide a alors lieu (Figure 15) (Prescott *et al.*,2010).

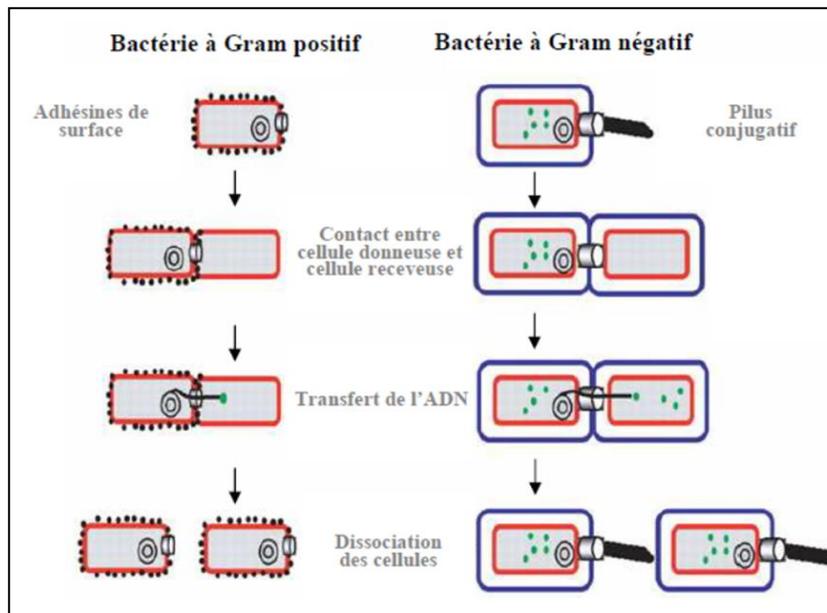


Figure 15 : Comparaison entre la conjugaison chez les bactéries gram positif et les bactéries gram négative (Hiron, 2008).

III. Transduction

1. Généralité

Ce phénomène a été mis en évidence en 1951 par Zinder et Lederbrg chez *Salmonella thphimurium*. Ces auteures cherchaient à recombinaer du mutants auxotrophes provenant de diverses souches de salmonella afin d'obtenir des prototrophes .C'est un autre phénomène qu'ils découvrirent, différent de la conjugaison. Deux souches auxotrophes de salmonella sont utilisées : l'un (2A) exige de l'histidine pour sa croissance, l'autre (22A) du tryptophane .Dans un tube U séparé a la base par une membrane de verre fritté interdisant le passage de des bactéries mais non celui des virus, on introduit d'un coté 10⁸ bactérie de la souche 2A et, de l'autre, 10⁸ de la souche 22A. Des prototrophes sont formé de ce dernier coté à une fréquence de 10⁻⁵ environ, mais aucun ne peut être isolé de la partie ensemencée avec la souche 2A. Les bactéries 22A portent un bactériophage (22A) qui traverse la membrane et lyse les cellules 2A : un nouvel agent filtrable est libéré .Quelque cellules de la souche 22A à son contact. Acquièrent de nouvelle propriétés ; elles deviennent de cultiver sans tryptophane cet agent filtrable n'est pas détruit par la désoxyribonucléase (Figarella et Calas, 2001).

Chapitre 2 : le transfert génétique

sa taille, sa constance de sédimentation, sa sensibilité à la chaleur et son inactivation par un sérum antiphage sont autant de caractères identiques à ceux de bactériophage P22 (**Figarella et Calas, 2001**).

2. Définition

Le troisième mode de transfert de gènes bactériens est la transduction. C'est un fréquent de transfert génétique horizontal dans la nature et il est dû à des virus. (**Prescott et al., 2010**).

3. Morphologie de phage

Les phages, ou Les bactériophages sont des virus bactériens ; c'est à dire des entités capables d'injecter leur matériel génétique dans une cellule procaryote pour s'y développer à ses dépens. Les phages les plus connus ; et surtout les plus utilisées comme vecteurs de clonage, sont les phages lambda (**Beaumont, 2010**).

Beaucoup de phages sont simplement constitués d'un acide nucléique enfermé dans une capsid protéique (le manteau) .selon le phage .Le génome peut être de l'ADN double brins , de l'ADN simple brin ,de l'ARN double brin, ou de l'ARN simple brin .certains phages sont polyédriques d'autres filamenteux ou pléiomorphes, et certains ont une « queue » par laquelle ils s'attachent à la cellule hôte .Dans de nombreux cas , un phage donné ne peut infecter que les cellules d'un seul genre, d'une seule espèce ou d'une seule souche (figure 16). L'effet de l'infection dépend du phage considéré et de la cellule hôte, dans une certaine mesure, des conditions extérieures les phages virulents se multiplient dans leurs cellules hôtes et les lysent c'est à dire que les cellules hôtes meurent et éclatent, libérant la progéniture du phage. Les phages tempérés peuvent établir une relation stable, non lytique (lysogénie) avec leurs cellules hôtes, d'autre phages encore peuvent se multiplier dans leurs cellules hôtes sans détruire, les phages s'échappant des cellules vivantes Tableau 2 (**Singleton,2011**).

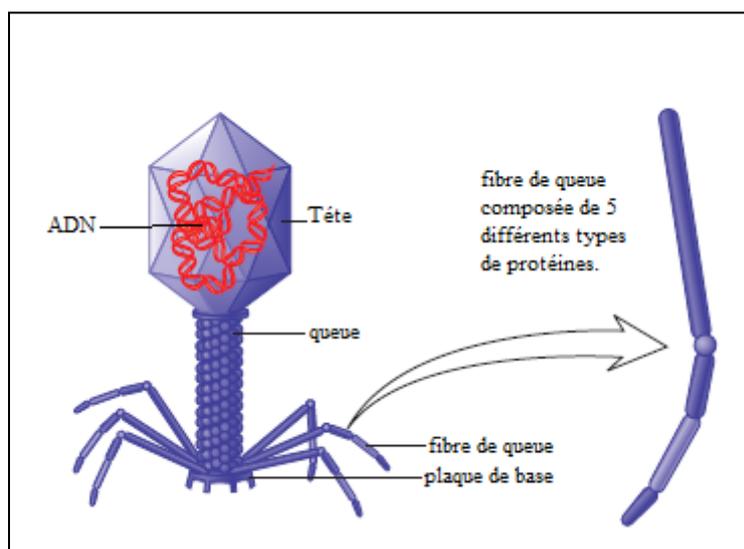


Figure 16 : structure de phage (Brooker, 2012).

Tableau 2 : Quelques exemples des bactériophages (Singleton, 2011).

Nom	Génome1	Morphologie2	Hôte principale
λ	ADN double brin linéaire	taille2 Tête isométrique, longue queue, non contractile ; env. 200nm	<i>Escherichia coli</i>
Mu	ADN double brin linéaire	taille2 Tête isométrique, longue queue, non contractile ; env. 200nm	<i>Entérobactéries</i>
T4	ADN double brin linéaire	Tête isométrique, queue courte ; env. 150nm	<i>Escherichia coli</i>
F1	ADN simple brin (ccc)	Icosaédrique, avec membrane lipidique interne ; env. 60nm	<i>Entérobactéries</i> (seulement les cellules donneuses conjugatives être infectées)
M12	ARN simple brin (ccc)	Icosaédrique ; Env.25nm	<i>Entérobactéries</i> (seulement les cellules donneuses conjugatives)

4. Types de transduction

4.1. Transduction généralisée

La transduction généralisée est réalisée par certains bactériophages virulents. Après infection d'une cellule, ces bactériophages subissent un cycle complet de réplication. Durant le processus d'infection, le chromosome de l'hôte est dégradé et l'ADN est utilisé comme source de blocs de nucléotides pour synthétiser le génome de phage (**Perry *et al.*, 2004**).

Occasionnellement, de relativement gros fragment d'ADN génomique restent dans le cytoplasme lorsque les phages forment leur capsid. Des erreurs d'encapsidation, peu fréquentes, conduisent à l'incorporation d'ADN bactérien a la place d'ADN phagique. A la fin du cycle d'infection, la cellule se lyse et libère les phages produits .Bien que la grande majorité des capsides contiennent l'ADN de phage et soient de ce fait pleinement capable de se lier a des cellules hôtes pour réaliser de nouveaux cycles infectieux, les rares capsides contenant de l'ADN bactérien vont également se lier a de nouveaux cellules hôtes et injecter dans le cytoplasme leur contenu génomique. Cette interaction entre cellule et phage ne conduit pas à la mort cellulaire car l'ADN introduit ne code pas pour les constituants de particules virales .Cependant la cellule hôte possède alors un fragment d'ADN génomique provenant d'une autre cellule. Ce fragment d'ADN se comporte comme tout fragment d'ADN introduit par un mécanisme d'échange de gène tel que la transformation. Si le fragment d'ADN introduit présente des homologies avec le chromosome de l'hôte, des évènements de double recombinaison réciproque pourront avoir lieu et conduire à l'intégration de l'ADN transduit dans le chromosome bactérien. Ce processus permet donc le transfert d'ADN d'une bactérie a l'autre (figure 17) (**Perry *et al.*, 2004**).

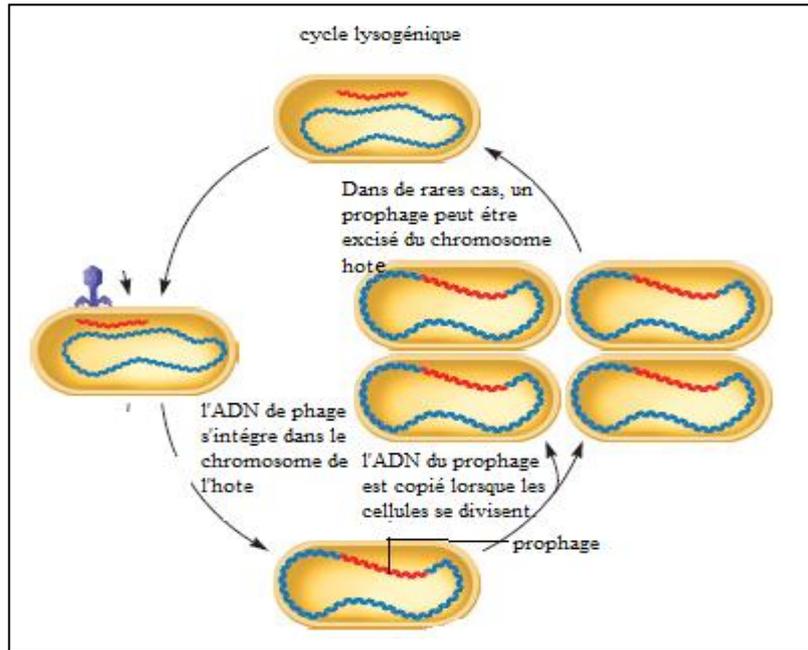


Figure 17 : cycle lysogénique d'un bactériophage (Brooker, 2012).

4.2. Transduction spécialisée

La transduction spécialisée nécessite l'incorporation de l'ADN viral dans le chromosome bactérien et n'est donc réalisée que par les virus lysogéniques. Elle a lieu après la formation du prophage, avec l'intégration de l'ADN viral au niveau d'un site spécifique du chromosome de la cellule hôte. Le prophage se réplique donc pendant plusieurs générations avec le chromosome bactérien, donc il fait partie intégrante (Perry *et al.*, 2004).

Occasionnellement, il peut s'exciser et initier un cycle virulent, supposant la répllication de l'ADN viral, l'encapsidation et la lyse de la cellule hôte. Cette excision peut être parfois imprécise et entraîner une partie d'ADN chromosomique flanquant l'ADN viral. Cet ADN excisé est alors inclus dans l'ADN viral, il se réplique avec lui et est encapsidé dans chaque particule virale produite. Après la lyse cellulaire, les bactériophages virulents libérés vont infecter de nouvelles cellules hôtes, conduisant à la répllication virale et à un nouveau cycle virulent. Cependant, comme le bactériophage initial, le virus transduit peut débiter un cycle de lysogénie supposant l'intégration chromosomique de l'ADN viral. Si la cellule hôte présente des séquences homologues aux séquences d'ADN bactérien transduites par le bactériophage, des événements de recombinaison réciproque sont susceptibles de se réaliser, conduisant à l'incorporation stable de ces gènes dans le chromosome bactérien indépendamment de l'établissement d'une lysogénie (Perry *et al.*, 2004).

La transduction spécialisée permet le transfert par des phages de gènes situés (**figure 18**) (Perry *et al.*, 2004).

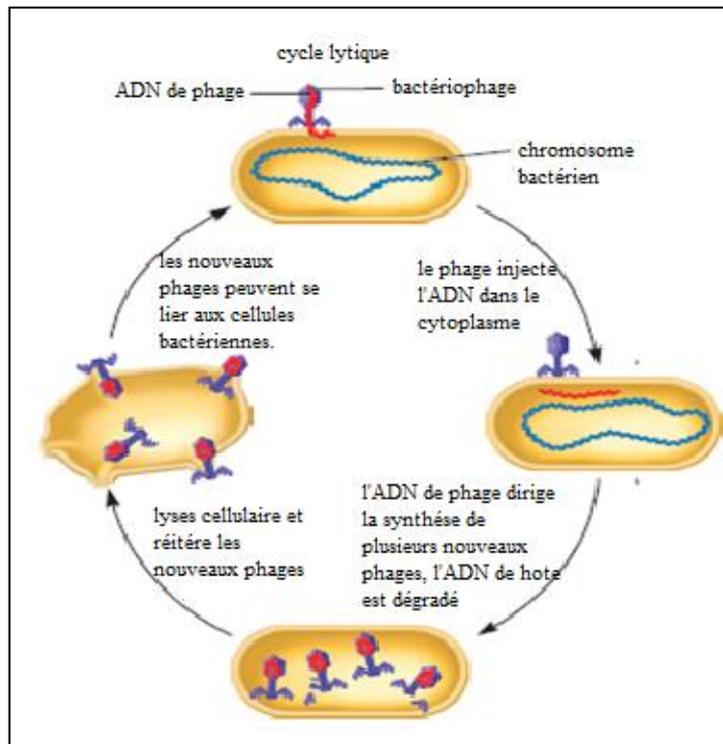


Figure 18 : le cycle lytique d'un bactériophage (Brooker, 2012).

4. 3. Conversion lysogénique

Les bactéries lysogénisées par un phage peuvent présenter certaines caractéristiques absentes des cellules non infectées. Cette conversion lysogénique peut être causée par l'expression des gènes du phage par les cellules, ou par l'inactivation des gènes chromosomiques lors de l'intégration du prophage. Par exemple, les souches de *Corynebacterium diphtheriae* qui provoquent la diphtérie sont lysogénisées par un certain type de phages qui encodent et expriment une toxine puissante. Les souches qui ne portent pas les phages ne peuvent fabriquer la toxine et ne causent pas la diphtérie. Chez *Staphylococcus aureus*, l'intégration du phage L54 a entraîné la perte d'une activité de lipase, due à l'inactivation du gène chromosomique correspondant. L'infection phagique peut modifier l'antigène O d'une bactérie hôte, affectant ainsi son sérotype (Singleton, 2011).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel biologique

Les souches utilisées dans notre travail ont été isolées et identifiées au sein du laboratoire de microbiologie à l'hôpital Ibn Zohr par notre collègue Mme Menidjel Nadia dans le cadre de son projet PFE sur les infections nosocomiales à bactéries multi résistantes. Les souches utilisées présentent des résistances et des sensibilités variantes au sein du même genre (tableau 3).

II. Culture des bactéries

Les souches conservées dans la gélose de conservation ont été prélevés par piqure centrale et ensemençer par des stries sur des milieux spécifiques (**figure 19**).

- *Les souches de Staphylococcus aureus* dans des boites contenant le milieu Chapman.
- *Les souches de Klebsiella pneumoniae*, d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa*, dans des boites contenant le milieu Mac conkey.
- *Les souches de Citrobacter koseri* et d'*Acinetobacter baumannii*, dans des boites contenant le milieu gélose nutritive.

Après 24h de revivification des souches sur milieu gélosé, une autre culture est ensemençée sur bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 24h.



Figure 19: l'ensemencement des souches sur des milieux d'isolement spécifiques.

Matériel et méthodes

Tableau 3 : les caractères génétiques des souches utilisées.

	Ceftriaxone	Ertapénème	Cefoxitine	Acide clavulanique + Amoxicilline	Céfotaxime	Ampicilline	Céfazoline	Oxacilline	Licomicine	Erythromycine	Pristinamycine
<i>Citrobacter koseri</i> (R6)	R	S	R	R	R	R	R	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	–	–	S	–	–	–	–	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA											
<i>Klebsiella pneumonia</i> (R4)	R	S	S	S	R	R	R	–	–	–	–
<i>Klebsiella pneumonia</i> (R4+I)	R	I	S	S	R	R	R	–	–	–	–
<i>Klebsiella pneumonia</i> (R4+I)	R	S	S	I	R	R	R	–	–	–	–
<i>Klebsiella pneumonia</i> (R3)	S	I	S	R	S	R	R	–	–	–	–
<i>Klebsiella oxytoca</i> (R6)	R	R	S	R	R	R	R	–	–	–	–
<i>E.coli</i> (R4)	R	S	S	S	R	R	R	–	–	–	–
<i>E.coli</i> (R5)	R	S	S	R	R	R	R	–	–	–	–

Matériel et méthodes

Tableau 3 : les caractères génétiques des souches utilisées (suite)

	Collistine	Amikacine	Gmn	Ciprofloxacine	Tobramycine	Imp	Fsf	Ceftazidime	Ticarcilline	Tcarcilline
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R7)	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>Acintobacter baumannii</i> (3I)	S	S	S	S	S	S	-	I	I	I
<i>Acintobacter baumannii</i> (2I)	S	S	S	S	S	S	-	S	I	I
<i>Acintobacter baumannii</i> (R7)	S	S	R	R	R	R	-	R	R	R

R : résistante.

S : sensible.

- : non testé.

III. Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction a pour but de séparer l'ADN plasmidique de l'ADN chromosomique de la cellule hôte. La technique la plus répandue comprend une étape de lyse alcaline (Ameziane, 2005).

Dans l'extraction on a suivi le protocole de Birnbiom 1983 (Yakhlef *et al.*, 2002) avec modifications (figure 20):

- Après d'une culture jeune de 24h, le milieu de culture liquide est d'abord éliminé par centrifugation à 12000g à 4°C pendant 1min.
- Resuspendre le culot dans 300 µl de Solution 1 (Tris-EDTA). En présence de la solution 1 à pH= 8 qui contient L'EDTA qui chélate les cations métalliques divalents (majoritairement le calcium et le magnésium) déstabilise la membrane bactérienne, et inactive les DNases.
- Ajouter 300 µl de solution 2 (SDS, NaOH), mélanger délicatement par inversion et incuber 5 min à température ambiante. La solution 2 qui contient la soude (NaOH) ainsi que du SDS, qui est un détergent. Les parois bactériennes sont fragilisées à pH basique. Au cours de cette étape les deux types des acides nucléiques sont dénaturés et la solution devient très visqueuse. Le pH est ensuite neutralisé rapidement ce qui aboutit à une forme soluble pour le plasmide et a un agrégat insoluble pour l'ADN chromosomique. Ce dernier incluant également les protéines dénaturées et le SDS précipité.
- Ajouter 300 µl de solution 3 (Acétate de potassium) et mélanger immédiatement mais délicatement par inversion du tube, constituée d'acétate de potassium à pH 5,5, la solution 3 permet aux brins d'ADN de se réapparier de façon complémentaire. L'ADN plasmidique se renature très vite car les brins n'avaient pas pu se séparer l'un de l'autre. La renaturation de l'ADN chromosomique nécessite plus de temps, et finalement ne peut avoir lieu car ces fragments d'ADN simple brin précipitent sous l'effet de la forte concentration en sels. L'ADN double brin reste en solution. Le SDS est éliminé lui aussi par précipitation. les débris des bactéries et l'ADN chromosomique précipitent.
- Centrifuger 10 min à 12000 g à 4°C et transférer le surnageant dans un microtube neuf.

Matériel et méthodes

- Ajouter 650 μ l d'isopropanol, mélanger par inversion et laisser précipiter pendant 3 min, puis Centrifuger 10 min à 12 000 g à 4°C.
- Aspirer le surnageant et ajouter 700 μ l d'éthanol 70 % et rincer le culot par inversion. L'ADN plasmidique est finalement précipité par addition d'isopropanol et d'éthanol. Ces alcools mobilisent l'eau du milieu, ce qui diminue la solubilité de l'ADN. Les charges négatives portées par les phosphates de l'ADN sont neutralisées par les ions potassium ajoutés lors de l'extraction.
- Vider doucement le surnageant en veillant à ce que le culot reste collé au fond du tube et retourner le tube ouvert sur une feuille de papier absorbant et laisser sécher le culot 10 min environ.
- Resuspendre le culot dans 30 μ l de tampon TE pH 8 (solution 1). Après centrifugation, l'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est précipité par l'éthanol et le culot après centrifugation repris par du TE ou de l'eau stérile.
- Garder les tubes à -20°C.

Matériel et méthodes

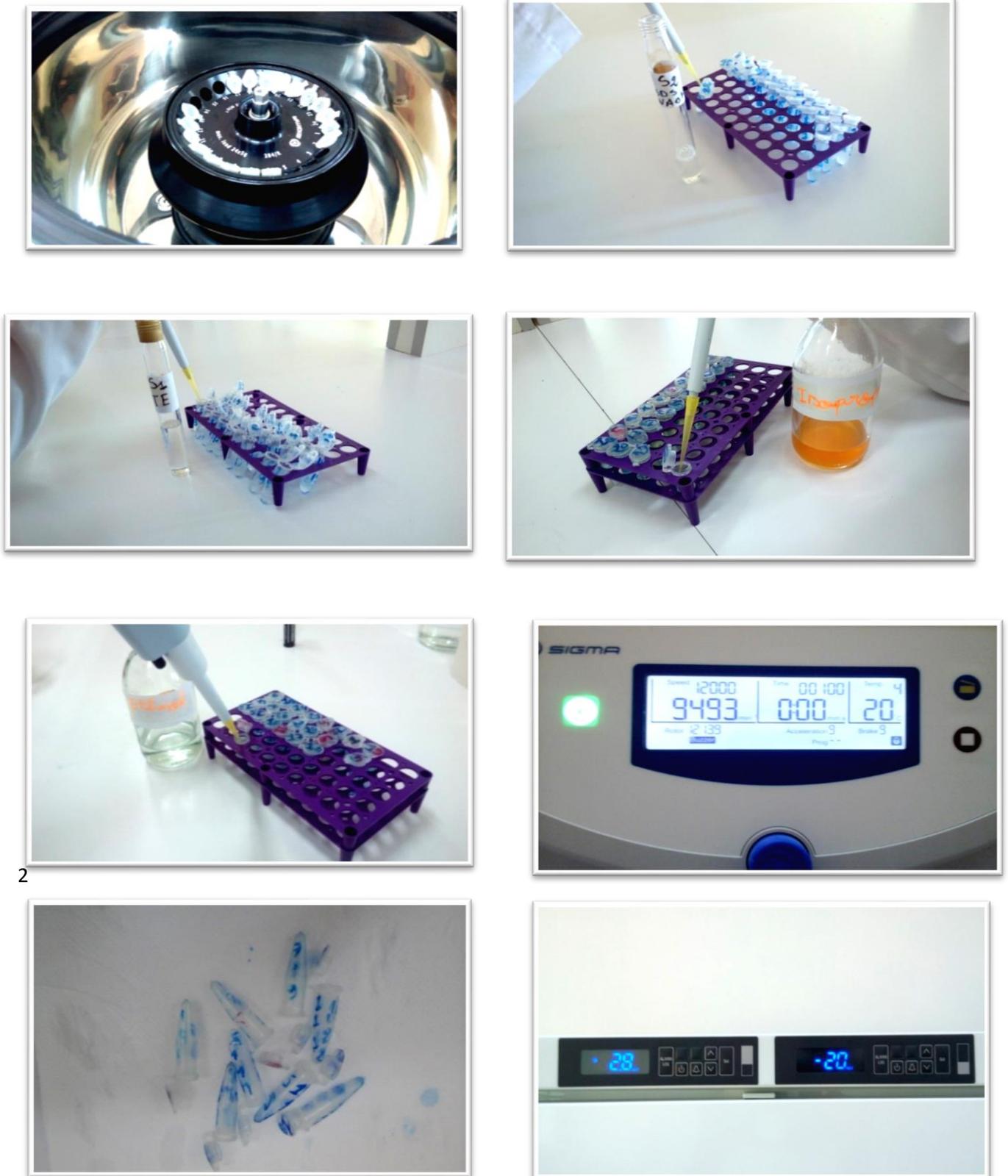


Figure 20 : les étapes de l'extraction de l'ADN plasmidique.

VI. 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 (**Karp, 2010**).

Pour mesurer la quantité de l'ADN plasmidique et la vérification de sa pureté, on a réalisé la spectrophotométrie. Au stade final de l'extraction de l'ADN plasmidique par la méthode de Birnboim, on a conservé l'ADN dans l'eau distillé stérile au lieu d'une solution aqueuse de Tris-EDTA pour faciliter la mesure et éviter la précipitation.

➤ Réglage de spectrophotomètre :

Afin de calibrer le spectrophotomètre, on :

- Sélectionner la longueur du chemin optique de la cuve.
- Choisir le facteur (ADN plasmidique) .
- Mesurer une solution vierge (référence) constituée d'eau distillé stérile (A₂₆₀ = 0) et (A₂₈₀=0).
- 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 0,2 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. Afin de réduire les erreurs de pipetage, la mesure devrait être répétée au minimum deux fois en utilisant à chaque fois 5 µl de la solution d'ADN au minimum.

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

Matériel et méthodes

nucléiques) et 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) la densité optique (DO)
Le calcul suivant a permis d'en déduire la concentration :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = 50 \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{DO } 260\text{nm}$$

La mesure de la DO à 280 nm permet de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines.

Le rapport DO 260nm / DO 280nm a été calculé afin de vérifier la pureté de notre extrait. Un rapport compris entre 1,7 et 2 désigne l'innocuité de l'échantillon, s'il est inférieur à 1,7 ceci signifie qu'il existe une contamination par les protéines. Un rapport supérieur à 2 témoigne la présence d'une contamination par l'ARN (**Debabza, 2015**).

V. Electrophorèse

Le principe de La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose est des molécules linéaires d'ADN séparée selon leur taille quand elles sont soumises à un champ électrique dans une matrice de gel qui est un matériel aqueux et poreux dont la structure rappelle celle de la gelée. Si l'on place l'ADN dans un champ électrique, il se déplacera vers le pôle positif car il est chargé négativement du fait de son caractère acide. Les molécules d'ADN sont flexibles et elles occupent un certain volume. Le gel agit à la manière d'un tamis moléculaire au travers duquel les molécules d'ADN en mouvement doivent passer. Les molécules les grand taille ont plus de difficultés pour passer travers les mailles créées par les réseaux des microfibrilles du gel et vont donc migrer plus lentement que les petits ADNs. Après un certain temps d'électrophorèse les molécules de tailles différentes sont séparées car elles ont migré à travers le gel à des distances, différentes selon leur taille. Une fois l'électrophorèse terminée, les molécules d'ADN sont visualisées par coloration avec des fluorophores comme l'éthidium qui se fixe à l'ADN en s'intercalant entre les bases empilées. Chaque bande fluorescente révèle donc une population de molécules d'ADN de même taille (**Watson *et al.*, 2009**).

Réalisée en deux étapes (**Costunbrado *et al.*, 2012**) avec modifications (**figure 21**):

➤ Préparation du gel

- Peser 1g d'agarose dans un Erlenmeyer avec 100 ml de tampon TBE (Tris, EDTA, acide borique). Le volume de tampon ne doit pas être supérieur à 1/3 de la capacité du ballon. Agiter pour mélanger.
- Faire fondre le mélange d'agarose / tampon sur une plaque chauffante à intervalle 30s, retirer la fiole et agiter le contenu pour bien mélanger. Répétez jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous.
- refroidir l'agarose par incubation dans un bain d'eau.
- Ajouter 10 μ L de bromure d'éthidium (BET) d'une solution stock de 10 mg / ml.
- Placez un peigne approprié dans le moule de gel pour créer des puits. Placez le plateau de gel dans l'appareil. Alternativement, on peut aussi coller les bords ouverts d'un plateau de gel pour créer un moule.
- Verser l'agarose fondu dans le moule de gel. Laisser l'agarose se solidifier à la température ambiante puis retirer le peigne. Alternativement, le gel peut aussi être emballé dans une pellicule plastique et conservés à 4°C jusqu'à son utilisation.

➤ Séparation des fragments d'ADN :

- Ajouter le tampon de charge (glycerol, bleu de bromophenole, xylen) aux échantillons d'ADN à séparer.
- Lentement charger 20 μ l de l'échantillon d'ADN dans chaque puits.
- Ajouter suffisamment de tampon TBE afin de couvrir la surface du gel.
- Remplacez le couvercle de la boîte de gel. La cathode (-) (fil noir) devrait être du côté des puits pour migrer vers l'anode (+) (fil rouge). Vérifiez que les électrodes sont branchées sur les emplacements corrects dans l'alimentation.
- Programmer l'alimentation de tension de 100V pendant une 1h15.
- Lorsque l'électrophorèse est terminée, éteignez l'alimentation et retirez le couvercle de la boîte de gel.
- Retirer le gel de la boîte. Égoutter le tampon en excès de la surface du gel. Placez le gel sur du papier absorbant pour absorber tout tampon supplémentaire.
- Retirer le gel à partir de la gouttière et l'exposer à la lumière UV. Les bandes d'ADN devraient se montrer fluorescentes en orangé.

Matériel et méthodes

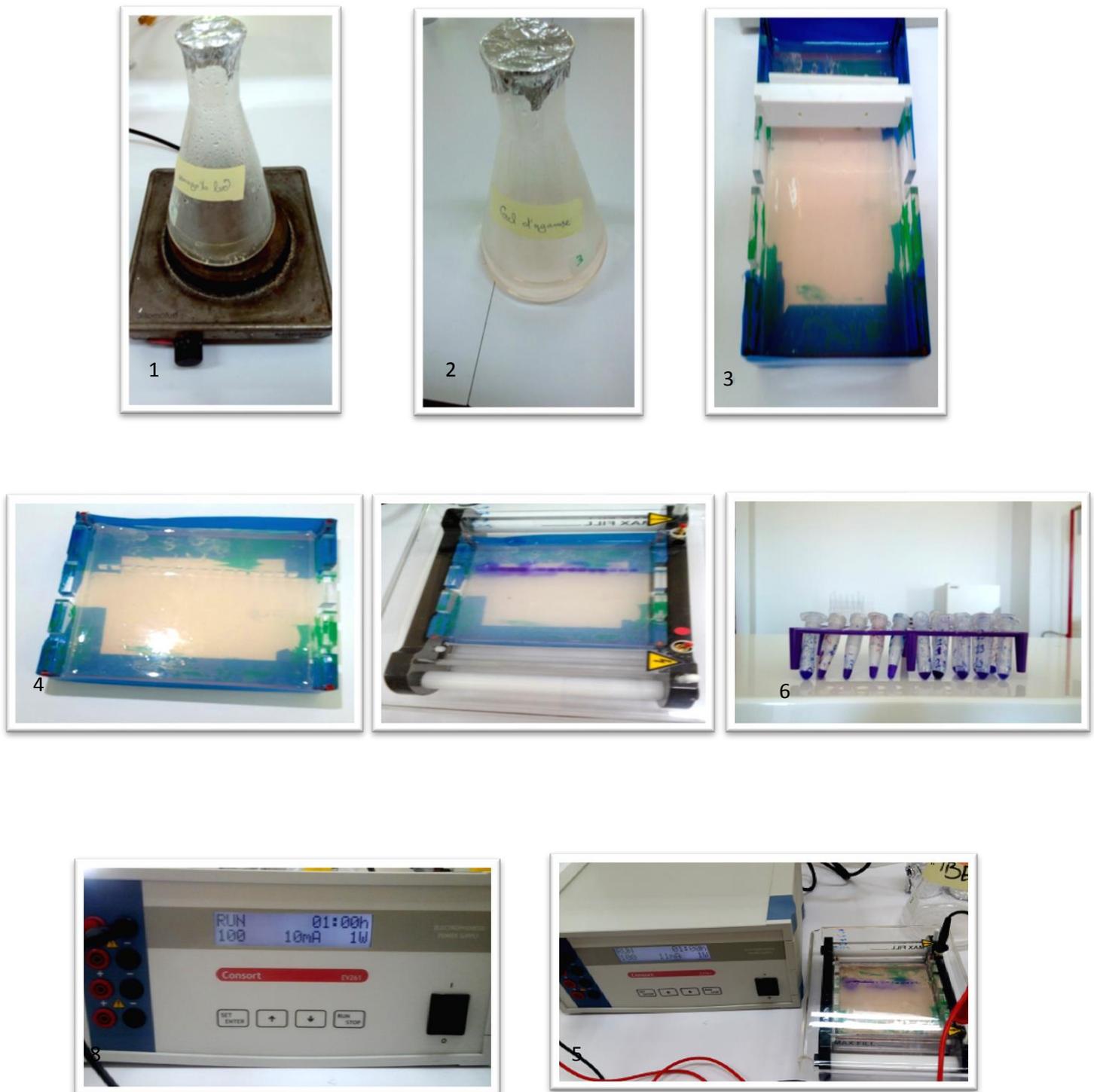


Figure 21 : les étapes d'électrophorèse

Résultats et discussion

I. Résultats :

1. Extraction de l'ADN plasmidique

Le produit obtenu après extraction précipite en formant une «pelote» qui remonte lentement à la surface format un amas blanchâtre de filaments qui s'échappe de la phase inférieure. Il s'agit ici de millions de filaments d'ADN provenant de nombreuses cellules. A l'aide d'un cure-dent il est possible de prélever le fragment et de se rendre compte de l'aspect visqueux des filaments d'ADN (figure 22).

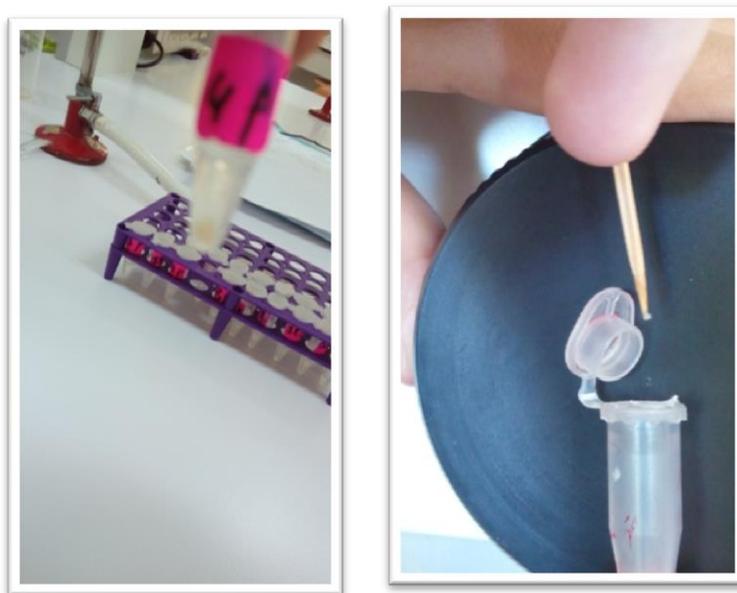


Figure 22 : précipité d'ADN plasmidique.

2. Concentration d'ADN plasmidique :

Les résultats du spectrophotomètre sont illustrés dans le tableau 4 qui décrit les valeurs d'absorbance de l'ADN plasmidique purifié dans l'eau distillé stérile aux longueurs d'ondes 280 nm et 260 nm.

Les résultats du rapport DO 260nm / DO 280nm montrent que la plupart de nos extraits d'ADN plasmidique (9/16) ne sont pas contaminés, (5/16) présente une contamination par l'ARN et deux extraits (2/16) indique une possible contamination par protéique.

Ce résultat nous permet de poursuivre notre travail concernant la mesure de la quantité d'ADN plasmidique présente dans nos extraits en fonction des absorbances de l'ADN à longueur d'onde 260nm.

Résultats et discussion

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

Les souches	260nm	280nm	DO 260nm / DO 280nm
<i>E.coli</i> (S)	0,19	0,10	1,9
<i>E.coli</i> (R5)	0,22	0,10	2,2
<i>E.coli</i> (R4)	0,24	0,14	1,7
<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	0,18	0,09	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (S5)	0,25	0,14	1,7
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	0,22	0,10	1,8
<i>Acinetobacter baumannii</i> (I2)	0,21	0,06	3,5
<i>Acinetobacter baumannii</i> (I 3)	0,20	0,08	2,5
<i>Acinetobacter baumannii</i> (R7)	0,23	0,11	2
<i>Citrobacter koseri</i> (R6)	0,20	0,13	1,55
<i>Klebsiella oxytoca</i> (R6)	0,18	0,08	2,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (R 3)	0,21	0,091	2,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (R4)	0,21	0,11	1,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (R4+I)	0,24	0,13	1,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (R4 +I)	0,26	0,16	1,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R7)	0,29	0,09	1,7

Les chiffres (1,2,...7) correspondent aux nombres des gènes de résistance.

 Extrait pure.

R : résistant.

 Extrait contaminé par l'ARN.

S : sensible.

 Extrait contaminé par les protéines.

Résultats et discussion

Après la mesure des absorbances de l'ADN plasmidique des souches bactériennes utilisées, on a procédé à la mesure de la concentration d'ADN plasmidique extraite de chaque souche selon la loi de :

La concentration ($\mu\text{g/ml}$) = $50 \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{DO } 260\text{nm}$.

L'histogramme présentant la concentration d'ADN plasmidique obtenu à partir des densités optiques de l'absorbance à $\text{DO} = 260 \text{ nm}$ de l'ADN extrait des souches (figure 23).

On observe que :

- les concentrations d'ADN plasmidique les plus élevées sont calculées chez les espèces qui portent le plus de gènes de résistance ceci est l'exemple de *Pseudomonas aeruginosa* (R7) avec une concentration de $14,5 \mu\text{g/ml}$, des deux souches de *Klebsiella pneumoniae* qui portent (R4 +I) avec une concentration de $12 \mu\text{g/ml}$ et $13 \mu\text{g/ml}$ respectivement, d'*E. coli* (R4) avec $12 \mu\text{g/ml}$ aussi et *Acinetobacter baumannii* (R7) avec $11,5 \mu\text{g/ml}$. sont variées chez les souches résistantes et sensibles aux antibiotiques.

Chez les espèces *Citrobacter koseri* (R6) et *Klebsiella oxytoca* (R6) malgré le nombre important de gènes de résistance qu'ils portent les concentrations de leurs extraits d'ADN plasmidique sont les plus faibles avec 10 et $9 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces espèces peuvent avoir une autre origine de résistance chromosomique et non plasmidique, ce qui explique la concentration faible d'ADN plasmidique extraite

- la concentration de l'ADN plasmidique varie au sein de la même espèce en fonction du nombre des gènes de résistance portés par la souche, ceci est observé chez les espèces *E. coli* (la (S) $9,5 \mu\text{g/ml}$, la (R5) $11 \mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus aureus* (la (S) $9 \mu\text{g/ml}$, la MRSA $10 \mu\text{g/ml}$) *Acinetobacter baumannii* (la (S) $10 \mu\text{g/ml}$ et la (R7) $11,5 \mu\text{g/ml}$) et *Klebsiella pneumoniae* (la (R3) $10,5 \mu\text{g/ml}$, la (R4) $10,5 \mu\text{g/ml}$, la (R4+I) $12 \mu\text{g/ml}$ et la (R4+I) $13 \mu\text{g/ml}$). Les souches sensibles ont des concentrations moindres par rapport aux souches résistantes et cette concentration est proportionnelle au nombre de gènes de résistance portés par la souche. Ce résultat montre que la résistance exprimée par ces souches a une origine plasmidique.

Dans le cas de la souche *Staphylococcus aureus* sensible avec $12,5 \mu\text{g/ml}$ d'ADN plasmidique et avec un coefficient de pureté qui montre que son extrait n'est pas contaminé (1,7). On peut exprimer ce résultat par l'existence de plusieurs plasmides cryptiques non conjuguatifs (non pas de rôle dans la conjugaison et l'acquisition de résistance chez la bactérie).

Résultats et discussion

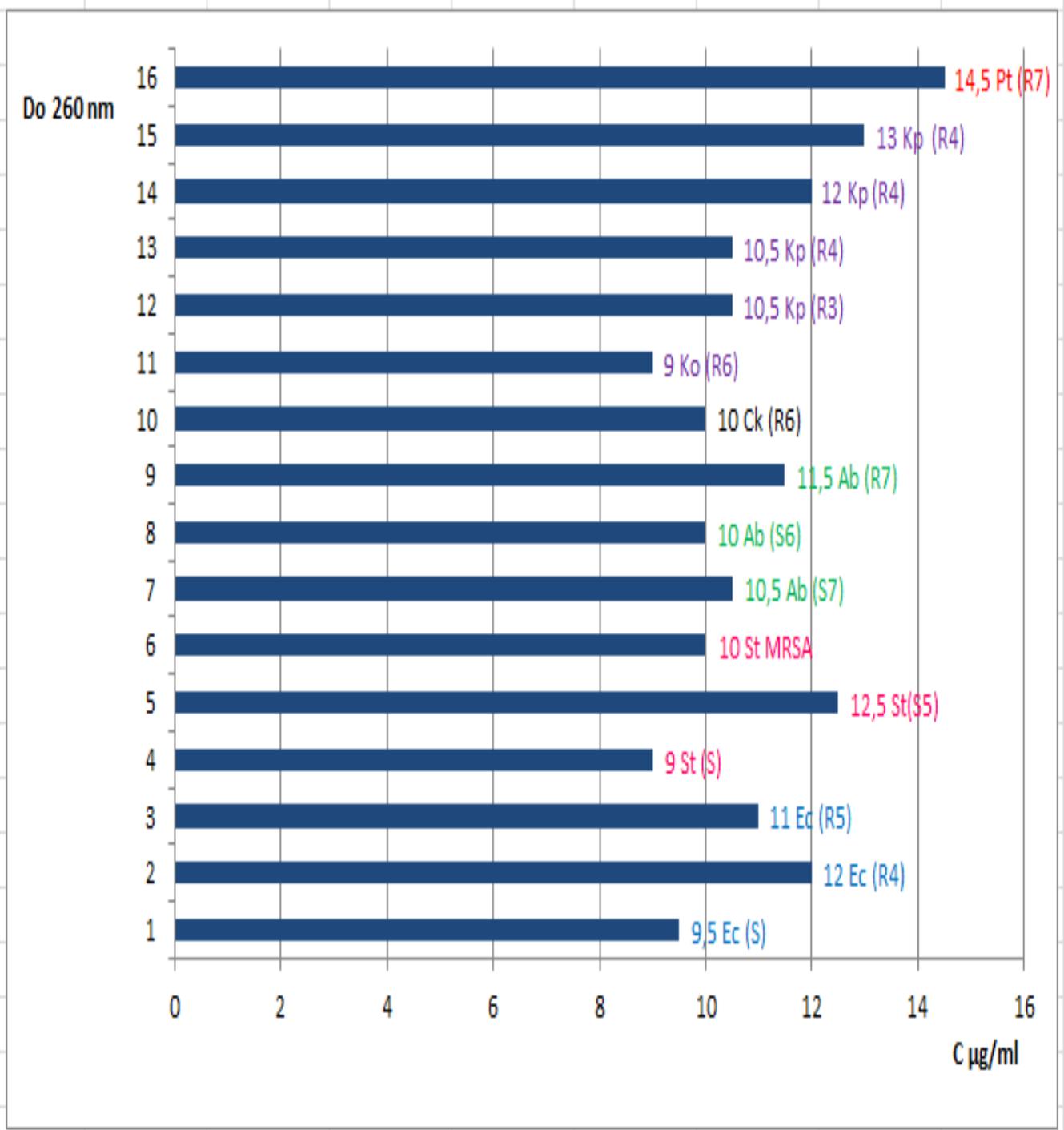


Figure 23 : Les concentrations en ADN des souches utilisées.

Ec : *E.coli*, St : *Staphylococcus aureus*, Kp : *Klebsiella pneumoniae*, Ps : *Pseudomonas aeruginosa*

Ck : *Citrobacter koseri*, Ko : *klebsiella oxytoca*.

Résultats et discussion

3. Electrophorèse :

Le résultat du profil électrophorétique démontré dans la figure 24 désigne la séparation des extraits d'ADN plasmidique obtenus des 16 souches bactériennes résistantes et sensibles aux antibiotiques étudiées dans un gel d'agarose de 1%.

Les bandes ont été visualisées grâce à l'utilisation du bromure d'éthidium qui un agent intercalant entre les bases d'ADN, a fluorescence rouge-orangée quand il est soumis à des rayons ultra-violetes au alentour de 300 nm. Sa fluorescence est augmentée lorsqu'il est lié à l'ADN double-brin, c'est pour cela on l'utilise de façon courante pour visualiser le résultat d'une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

La mobilité électrophorétique de ces fragments d'ADN plasmidique varie selon la taille : (les molécules d'ADN linéaire double brin migrent d'autant plus rapidement que leur taille est petite). Le diamètre des pores du gel d'agarose participe à la séparation des plasmides qui dépend de la concentration utilisé (1% d'agarose) qui sépare des fragments d'ADN de taille comprise entre 250 pb et 12000 kb.

la migration liée aussi à d'autres facteurs : le voltage et la force du tampon de migration (TBE).

- On observe sur les pistes 2, 6, 16 correspondant aux espèces sensibles *Staphylococcus aureus* dans les puits 2 et 16 et *E. coli* au puits 6, l'absence de fluorescence donc l'absence de plasmides.

- les autres souches qui possèdent soit des résistances aux antibiotiques ou expriment un état intermédiaire de résistance montrent toutes la présence d'un certain nombre de plasmide qui diffèrent entre les espèces.

Deux bandes apparaissent dans les pistes [9,13 et14] correspondant aux souches *Citrobacter koseri* (R6), *Klebsiella pneumoniae* (R3), *Acintobacter baumannii* (R7), et *Klebsiella oxytoca* (R6) ce qui indique l'existence de deux plasmides chez ces souches. Ces bandes sont de taille différente du faite de leur éloignement dans le gel.

La séparation et la distinction de 4 bandes chez les deux souches *Klebsiella pneumoniae* (R4+I) sur les pistes [3 et 4], sur les pistes [5,8,10] apparaissent 3 bandes d'ADN appartenant aux souches *Escherichia coli* (R4), *Pseudomonas* (R7) et *Klebsiella pneumoniae* (R4). A la

Résultats et discussion

piste [7] d'*Escherichia coli* (R5) et à la piste [15] de *Staphylococcus aureus* on obtient une seule bande.

Chaque bande qui apparait sur les pistes correspond à un plasmide présent dans la souche bactérienne. On peut conclure que la majorité des résistances bactériennes est d'origine plasmidique.

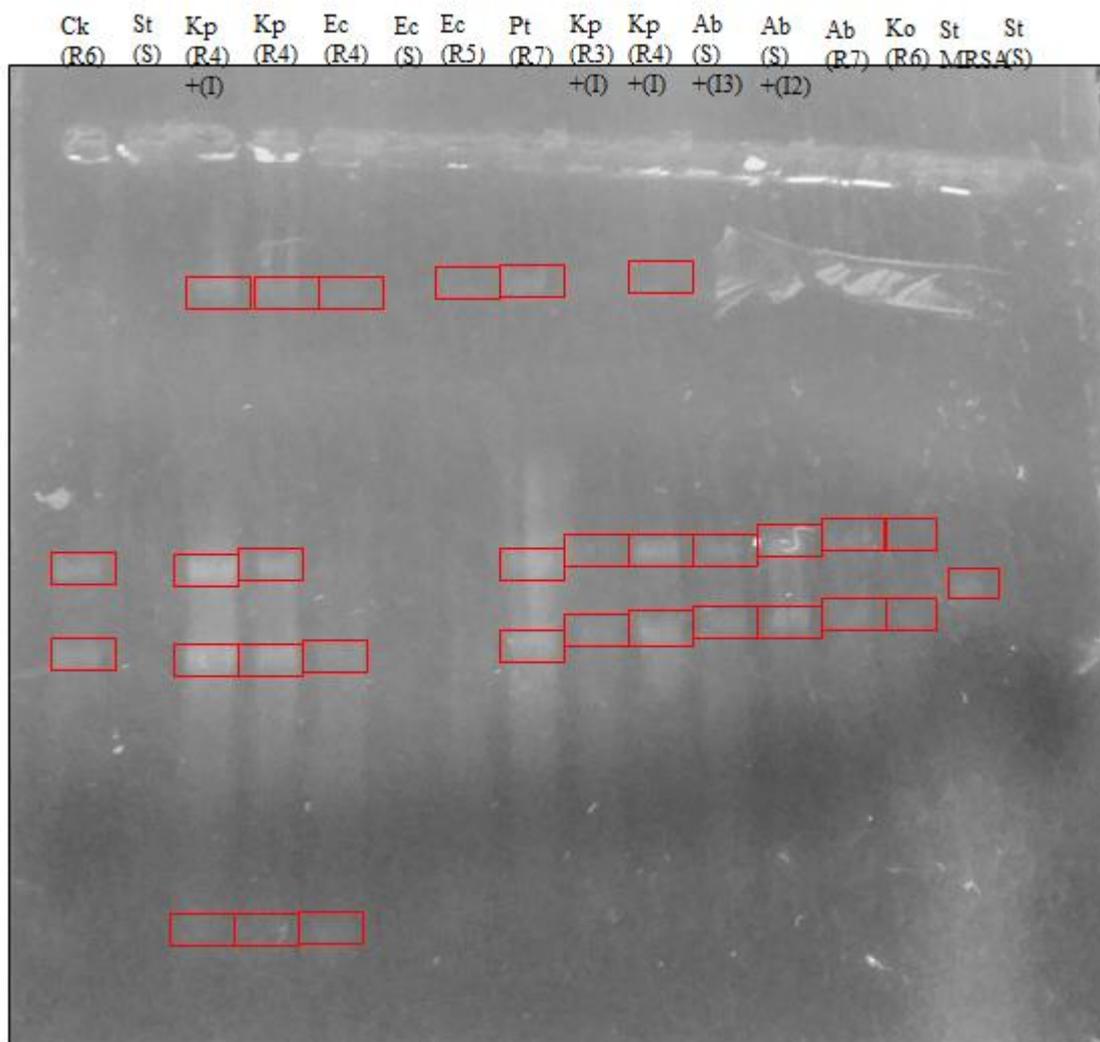


Figure 24 : profile électrophorétique de l'ADN plasmidique.

Ec : *E. coli*

Ko : *klebsiella oxytoca*

St : *Staphylococcus aureus*

Ps : *Pseudomonas aeruginosa*

Ck : *Citrobacter koseri*

Kp : *Klebsiella pneumoniae*

II. Discussion

Au terme de notre étude sur l'extraction de l'ADN plasmidique des bactéries associées à l'infection nosocomiale dont l'objectif était la caractérisation du type de la résistance aux antibiotiques. Cette résistance peut être d'origine plasmidique ou chromosomique.

Les concentrations des ADN plasmidiques mesurés par la spectrophotométrie sont variés d'une souche résistance à une autre, la souche *Pseudomonas aeruginosa* résistante à 7 antibiotiques (Gmn -Ciprofloxacine- Tobramycine- Imp- Fsf- Ticarcilline- Tcarcilline) a une concentration de 14,5µg/ml qui est la plus élevée parmi toute les souches étudiées.

L'espèce *Klebsiella pneumoniae* (R4) qui possède une résistance à (céfazoline - ceftriaxone - céfotaxime - Ampicilline) avec une C=10µg/ml, cette concentration a augmenté en fonction du nombre de gènes de résistance intermédiaire dans les autres souches de la même espèce qui présente (R4+I) intermédiaire a l'antibiotique ertapénémme cela signifie que la concentration dépend du nombre de gène de résistance donc la résistante au sein des souches est portée par les plasmides.

Pour l'espèce d'*E.coli* (R4) qui possède une résistance à (céfazoline , céfotaxime, ampicilline et ceftriaxone avec une C= 12µg /ml par rapport à *E.coli* (R5) par la résistance en plus à l'antibiotique acide clavulanique + amoxiciline qui présente une concentration 11µg /ml cela indique que la résistance chez cette espèce peut être plasmidique et chromosomique.

Quant à *Acinetobacter baumannii* (R7) résistant à (collistine, amikacine, gm ,ciprofloxacine, tobramycine, imp, fsf, ceftazidine, ticarcilline et tcarcilline) (C=11,5µg/ml), et pour *Acinobacter baumannii* qui porte deux résistances intermédiaires (I2) aux ticarcilline et tcarcilline) à une concentration égale à 10,5µg/ml supérieur à *Acinobacter baumannii* (I3) C=10 µg/ml résistant en plus des deux ATBs ticarcilline et tcarcilline au ceftazidine par une résistance intermédiaire cela indique que les gènes codés pour la résistance à cet antibiotique (ceftazidine) au sein de cette souche est plutôt d'origine chromosomique et la résistance aux autres antibiotiques est d'origine plasmidique.

Chez les Gram positif la souche *Staphylococcus aureus*(S) possède une concentration élevé C = 12,5µg/ml parce qu'elle possède probablement plusieurs plasmides de petite taille cryptique et non conjugatif qui peuvent atteindre un nombre de plus de 50 plasmides par cellule ce qui explique la grande quantité d'ADN plasmidique extrait de cette souche.

Résultats et discussion

La souche *Staphylococcus aureus* MRSA présente une concentration C=10 µg/ml plus que la souche *Staphylococcus aureus*(S) qui a une C=9µg/ml, ce résultat signifie que la résistance aux antibiotiques est d'origine plasmidique chez cette espèce.

En ce qui concerne *Citrobacter koseri* la concentration est faible de 10µg/ml malgré le nombre de gènes élevé de résistance (R6) exprimé donc probablement la résistance chez cette espèce est d'origine chromosomique vu la faible concentration d'ADN plasmidique par rapport aux autres souches faisant partie de cette étude.

Pour bien préciser le locus de la résistance de ces souches bactériennes, Les fragments sont séparés dans un gel d'électrophorèse.

Dans le cas des souches résistantes, il existe une variation de nombre des bandes sur chaque piste qui correspond à chacune des souches. Chez la bactérie *Staphylococcus aureus* (MRSA) une seule bande est apparue, chez les souches *Pseudomonas aeruginosa* (R7) et *Klebsiella pneumoniae* on distingue 3 bandes et pour les deux souches *Klebsiella pneumoniae* (R4 +I), 4 bandes sont observées. chez *Klebsiella oxytoca*(R6), *Acinetobacter baumannii* (R7) et *Citrobacter koseri* (R6) deux bandes sont observés. Chez *E. coli* (R5) une seule bande est distinguée. Le nombre des bandes est proportionnel aux nombres de plasmides existants dans la souche. Donc on peut déduire que l'origine de la résistance bactérienne de ces souches pour la majorité des antibiotiques est d'origine plasmidique

Dans le cas des souches sensibles *E.coli* (S) et *staphylococcus aureus* (S), aucune bande n'est observée au niveau des pistes correspondants à ces souches ce qui montre l'absence des plasmides de nature conjuguatifs.

Nos résultats concordent avec les travaux de Debabza, 2015 qui a trouvé des profils plasmidiques chez les souches d'*Escherichia coli*, de *Klebsiella pneumoniae*, de *Pseudomonas aeruginosa* et chez *Acinetobacter baumannii*. Ces travaux montrent une corrélation significative entre la présence des plasmides et la résistance aux antibiotiques testés. Ainsi, les souches multi résistantes ont montré la présence de plasmides de taille importante, alors que les souches sensibles ne montrèrent aucune bande donc l'absence de plasmides.

L'analyse de ces profils a montré que ces souches multi résistantes hébergent de 1 à 4 plasmides de différentes tailles allant de 1Kb à 170Kb. Les expériences de la conjugaison

Résultats et discussion

réalisées ont montré le co-transfert de la résistance à la gentamicine et au cotrimoxazole sur des plasmides de 10Kb, 20Kb, 125Kb ou 165Kb. La PCR des souches transconjugantes a permis de détecter les gènes *bla CTX-M-1*, *bla TEM* et *bla SHV*. Concernant la recherche moléculaire de la résistance aux quinolones, les résultats ont montré la présence des gènes *qnrB* transférés sur des plasmides de 125Kb. Cette étude montre que l'environnement hospitalier est fréquemment contaminé par les bactéries à Gram (-) multirésistantes en particulier les entérobactéries productrices de bêta lactamase à large spectre, et qu'il peut être une source potentielle des épidémies ce qui incite à proposer des recommandations au sein des structures sanitaires. Ainsi que Les produits PCR trouvé par Boudjemaa, 2015 ont montré qu'une souche productrice d'une lactamase de type *blaCMY-2* à médiation plasmidique dont le gène a été transféré par électroporation. Les expériences de conjugaisons montrent que les gènes *blaCTX-M*, *blaTEM*, les *blaSHV* sont portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire (≥ 70 kb).

Par ailleurs, la recherche moléculaire du support génétique des résistances aux aminosides et aux fluoroquinolones a révélé une diversité génétique des gènes qui codent pour les BLSE avec l'émergence de nouveaux gènes dans le centre hospitalier universitaire d'Annaba. De plus, cette étude confirme la propagation internationale du gène CTX-M-15 qui était hébergé par 95% des *Kp* BLSE. Quant à la résistance aux aminosides, a été détecté pour la première fois l'émergence de souches de *k p* productrices du gène *armA* qui confère la résistance à tous les aminosides cliniquement pertinents au niveau des CHU d'Annaba, rendant ainsi les options du traitement des infections causées par ces micro-organismes plus restreintes. De plus, la présence de ces déterminants de résistance sur un plasmide conjugatif favorise leur mobilité et leur dissémination a été également mentionnée dans les travaux de Belbel, 2014 sur L'analyse des profils d'antibiorésistance des transconjugants.

La méthode de diffusion en milieu solide, étudiée par Boudjemaa, 2015, montre que le transfert de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux triméthoprim/sulfaméthoxazole a un support plasmidique chez la souche *Escherichia coli K12*.

Ces travaux montrent une corrélation significative entre la présence des plasmides et la résistance aux antibiotiques testés. Ainsi, les souches multirésistantes ont montré la présence

Résultats et discussion

de plasmides de taille importante, alors que les souches sensibles ne montrèrent aucune bande donc l'absence de plasmides.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les bactéries isolées du milieu hospitalier sont des germes opportunistes, et en raison de leur résistance à une large variété d'antibiotiques, elles sont les agents responsables d'infections nosocomiales sévères. Parmi les menaces actuelles, la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif et la propagation dans le monde entier des gènes de résistance constituent une préoccupation majeure de la communauté scientifique.

Les techniques de biologie moléculaire ont démontré leur utilité pour étudier la résistance bactérienne. Dans ce contexte le but principal assigné à ce travail est de confirmer et détecter la résistance bactérienne des germes isolés de l'hôpital.

La plupart des souches résistantes testées dans cette étude exprime des concentrations d'ADN plasmidique croissante en fonction du nombre de gènes de résistance exprimés. Ce constat a été confirmé par l'électrophorèse qui montre l'appariation de bandes spécifiques correspondantes aux nombre de plasmides présents au sein des souches soumis à cette opération excepté les souches sensibles qui ne montrent aucune bande dans les pistes les correspondants. Ceci indique que l'origine de la résistance aux antibiotiques est plasmidique. Notre travail reste préliminaire, l'identification des gènes et la connaissance des bases génétiques déterminantes de la résistance bactérienne aux antibiotiques au niveau du plasmide, nécessite le recours à des techniques plus approfondies en biologie moléculaire.

Résumé

Les bactéries sont souvent la principale cause d'infections nosocomiales en raison de leur résistance à une large variété d'antibiotiques. Les gènes de résistance aux antibiotiques situés sur le chromosome bactérien, ou sur des plasmides. Ces gènes peuvent se transposer et se mobiliser entre les différents réplicons sur le matériel génétique, qui peut être échangé par la transformation, la conjugaison et la transduction. L'analyse des produits de l'extraction des ADN plasmidiques par la méthode de Birnboim des 16 souches isolées du milieu hospitalier, par les techniques de spectrophotométrie et d'électrophorèse sur gel d'agarose, nous ont permis de situer l'origine de la résistance pour la plupart de ces souches au niveau des plasmides c'est le cas de la souche à Gram positif *Staphylococcus aureus* multi résistantes aux antibiotiques, et les souches à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* (R7), *Klebsiella pneumoniae* (R3), *Klebsiella pneumoniae* (R4+I), *Klebsiella pneumoniae*(R4), *Acinetobacter baumannii* (R7), *Citrobacter koseri* (R6), *E. coli* (R4), et *E. coli* (R5). À l'exception des gènes de résistance à l'antibiotique acide clavulanique +Amoxicilline chez *E.coli* (R5) et le gène de résistance intermédiaire (Ceftazidime) chez *Acinetobacter baumannii* (3I) qui sont probablement situés sur le chromosome.

Mots clés : infection nosocomial, résistance aux antibiotiques, plasmide, transfert génétique.

Abstract

Bacteria are often the main cause of the nosocomial infection due to their resistance to a large variety of antibiotics. The antibiotic resistance genes are located on the bacterial chromosome, or on plasmids. These genes can be moved and mobilized between different replicons on the genetic material, which can be exchanged by the transformation, conjugation and the transduction. The analyses of the plasmids DNAs extraction products by Birnboim method of 16 isolated strains from the hospital environmental, by the spectrophotometry and agarose gel electrophoresis techniques allow us to locate the resistance origin for most of these strains at plasmids the case of the Gram positive strain *Staphylococcus aureus multi antibiotic resistance*, Gram negative strains *Pseudomonas aeruginosa* (R7), *Klebsiella pneumoniae* (R3), *Klebsiella pneumoniae* (R4+I), *Klebsiella pneumoniae*(R4) , *Acinetobacter baumannii* (R7) , *Citrobacter koseri* (R6), *E. coli* (R4) and *E. coli* (R5). The exception in the resistance genes of acid clavulanic +Amoxicilline in *E.coli*(R5) and the gene of intermediate resistance Ceftazidime in *Acinetobacter baumannii* (3I) probably located on the chromosome.

Keywords: Nosocomial infection, bacterial resistance, plasmid, genetic transfer.

ملخص

البكتيريا غالبا ما تكون السبب الرئيسي لعدوى المستشفيات بسبب مقاومتهم لطائفة واسعة من المضادات الحيوية. الجينات المقاومة للمضادات الحيوية تتموضع على الصبغي البكتيري أو على البلازميدات. هذه الجينات تنقل بين مناطق التضاعف المختلفة من المادة الوراثية، والتي يمكن تبادلها عن طريق التحول، والاقتران والتنبيغ. تم تحليل نتائج البلازميدات المستخرجة بطريقة بيرنبوان من ستة عشر سلالة معزولة من المستشفى بتقنيات الطيفية والاعاروز الكهربائي للهلام، اللذين سمحوا بتحديد اصل مقاومة المضادات الحيوية لهذه السلالات حيث تتموضع على مستوى البلازميد في حالة مقاومة إيجابية الجرام؛ المكورات العنقودية الذهبية سلالة متعددة للمضادات الحيوية، وغرام السلبية؛ سلالات الزائفة الزنجارية (R7)، الكلبسيلة الرئوية (R3)، الكلبسيلة الرئوية (R4 + I)، الكلبسيلة الرئوية (R4)، الراكة (baumanii) (R7)، الليمونية koseri (R6)، اشيريشيا القولونية (R4)، اشيريشيا القولونية (R5). باستثناء مورثة أموكسيسيلين +كلافولانيك و الجينات المقاومة للمضادات الحيوية الحمضية في إشيريا القولونية (R5) والمقاومة المتوسط الجين (cefalzadine) في الراكة (baumani) (3I) ربما تقع على الصبغي.

الكلمات المفتاحية: عدوى المستشفيات، المقاومة للمضادات الحيوية بلازميدات، الانتقال الوراثي.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ameziane, Nadjma. Bagard, Marc. Lamoril, Jérôme. Principes de biologie moléculaire en clinique. Paris : © Elsevier s.a., 2006, 707p, ISBN : 2-84299-685-2.
- Beaumont, Simon. Biologie moléculaire-UE1. 3^e ed. paris : © Dunod, 2010, 315p. ISBN: 978-10-054503-2.
- Belbel, Zineb. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Faculte des sciences departement de biochimie : Université Badji Mokhtar Annaba , 2014 , 146p.
- Billy C. Détection génotypique des résistances bactériennes : de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaires. Réanimation. (2003), 12, 192–197.
- Boudjemaa, Djahida. Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez *Enterobacter cloacae*. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers Département de Biologie : Université Abou Bekr Belkaid–Tlemcen, 2015, 143p.
- Boulahbal F. Microbiologie. Place Centrale de ben –Aknoun :offises publications universitaire, 2002, 173p. ISBN : 3-10-2487.
- Briand, Yvon Michel. Aspects de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Paris : © l'Harmattan , 2012, 515p. ISBNB : 978-2-336-00546-1.
- Brooker, Robert J. Geneties .4e ed. Include index, 2012. 761p, ISBN: 0-07-352528.
- Christina M. Collis Et Ruth M. Hall. Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons. American Society for Microbiology. 1995, 39, 1, p 155–162. ISBN: 0066-4804/95/\$04.0010 Disponible à l'adresse : Downloaded from <http://aac.asm.org/> on May 6, 2017 by guest.

- Dale, Jeremy W. Park, Simon F. Molecular Genetics of Bacteria. 4^e ed. England: Copyright ©, 2004. 337p, ISBN 0 470 85085 X (pbk).
- Debabza, Manel. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Département De Biochimie : Université Badji Mokhtar-Annaba, 2015, 217p.
- Etienne J., Clauser E., Housset C., Roingard P. Biologie génétique Biologie moléculaire. 9^e ed. rue Camille-Desmoulins : © Elsevier Masson S.A.S.,2006, 249p. ISBN :2-294-02131-2.
- Haytham, Yassine. Etude de la séquence d'insertion IS1294b et de son implication dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries. Ecole doctorale des Sciences de la vie et de la santé : Université de Bordeaux , 2015. 512p.
- Guillot J.F. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques [en ligne]. HAL. 1999, 20 (1), 3-16. (Consulté le 20- 03-2017). Disponible à l'adresse : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00901839>.
- Karp,.biologie cellulaire et moléculaire 5e ed. bruxelles : groupe de boeck.s.a.,2010. 815p, ISBN : 978041-0011-1.
- Kayser,Fritz H. Bottger, Erik C. Zinkernagel, Rolf M. Haller Otto, Eckert Johannes. Deplazes, Peter. Microbiologie médicale. 11eed. allemande : Flammarion Médecine-Sciences.©,2008. 764p, Falmmarion s.a. ,nbr ,ISBN :978-2-2571-1335-1.
- Lee,Pei Yun. Costumbrado, John. Hsu, Chih-Yuan. Kim, Yong Hoon. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Journal of Visualized Experiments. (2012), (62), 1-5, doi:10.3791/3923.

- Lewin, Benjamin. Genes V. paris : © de Boeck université, 1999, ISBN : 2-744500240.
- Madigan, Michael T. Martink, johan M. Sthal, David A. clark, David P. biology of microorganism. 13e ed. Includes index, 2011. 1046p, ISBN: 10-0-331-64963x.
- Merlin, Christophe. Toussaint, Ariane. Les éléments transposables bactériens. Société Française de Génétique.1999, 15, 8-9.
- Meyer, Alphose. Deiana, José. Bernard, Alain. Cours de mrobiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2e éd. Doin , 2010, 430p.
- Naucil C. et Vilde J-L. Bactériologie médicale. 2° ed. paris : © Masson, 2005. 233p, ISBN : 2-294-01857-3.
- Nicklin J. Graeme-cook K. Paget T. Killington R. Microbiologie. ©Port Royal Livres, 2000. p, Paris.
- Paolozzi, luciano et Liébart, Jean-Claude. Microbiologie. Paris : ©Dunod, 2015, 365p. ISBNB : 978-2-10-075005.
- Perry Jerome J. Staley james T. Lory, Stephen. Microbiologie cours et questions de revision . paris : © Dunod, 2010, 173p. ISBN : 210007234 X.
- Prescott, lansing M. Harley Johan P. Klein,Wiley, Donald A, Sherwood. Woolverton .Mocrobiologie. 3e edition. Bruxelles:© Groupe de boeck s.a, 2010, 1086p. .ISBN : 978-2-8041-6012-8.
- Prescott lansing M. Harley Johan P. Klein Donald A. Mocrobiologie. 2° edition. Bruxelles:© De boeck & Larcier s.a, 2003, 1137p .ISBN : 978-2-8041-4256-8.
- Ploy, Marie-Cécile et Denis, François. Les intégrons : un système original de capture

de gènes chez les bactéries. médecine/sciences, 2000 , 16 ,2,P 256-258.

- Schaeche R. medof F. Eisenstein N. Microbiologie et pathologie infectieuse. 2^e ed. paris : © Deunad, 1999, 834p, ISBN : 28041-15925.
- Singleton , Paul. Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologies. 6^e ed. DUNOD.
- Swynghedauw, Bernard. Biologie et génétique moléculaires Aide-mémoire. 2^e ed. paris : ©Dunod, 2000. 156p. ISBN : 2 10 005068 0.
- Thomas, Frédéric. Lefèvre, Thierrg. Raymond, Michel. Biologie évolutive.2^e ed. Rue du Bosquel : © de Bceck supérieur.s.a.,2016, 939p. ISBN : 978-2-8073-0296-9.
- Tortora,Garard J. Funke, Berdell R. Case,Christine L. Micorobiology. Copyright © 2013, 815p. ISBN : 100-321-73360.
- Yakhlef, Salah-Eddine Bakkali. Assali, Nour-Eddine. Amara, Abdelkader. Belabed, Abdel-Majid. Analyse de la diversité génétique des plasmides d'Escherichia coli antibiorésistants causant la colibacillose aviaire. Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc), 2002, 22 (2), 103-108.
- Watson, James. Baker, Tania. Bell, stephen. Gann, Alexander. Levine, Michael. Losick,Richard. Biologie moléculaire du gene. 6^e éd. Paris : © pearson education France , 2009, 682p. ISBN: 978-2-7348-9.

