

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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

UNIVERSITE 8 MAI 1945 DE GUELMA
FACULTE DES SCIENCES ET DE L'INGENIERIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE MASTER

DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE.
SPECIALITE : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRES.
OPTION : BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PROCARYOTES.

Thème

Extraction de l'ADN plasmidique et transfert du caractère de la résistance
aux antibiotiques chez *E.coli*.

Présenté par :

- Baitiche Amel.
- Kafi Fadhila.

Membres de jury :

Président : BOUABID R.

Examineur : AYAD H.

Promoteur : BENOURETH D.E.

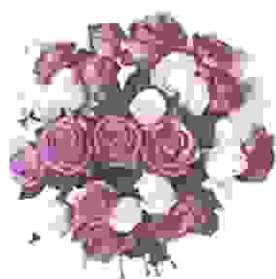
MAT Université de Guelma.

MAT Université de Guelma.

Prof Université de Guelma.

Juin 2010





REMERCIEMENT

Avant toute chose, nous tenons à exprimer nos profonds remerciements envers notre Dieu, qui nous a donné la force et la volonté de mener à bout nos formations par ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre respectueux remerciement à notre encadreur Mr. Benouareth, qui nous a inespérées le sujet de ce modeste mémoire, qui nous a orientées et conseillées tout au long de travail, qu'il soit vivement remercié.

Nous remercions également : M^{lle}. Bouabid Rima, d'avoir bien voulu accepter de présider notre jury.

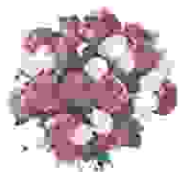
Nos gratitudes vont également à M^{me}. Ayad Hayat, pour l'honneur qu'elle nous fait d'examiner notre travail.

Nous tenons à remercier tous le staff de laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ibn Zohr .Guelma.

Un profond remerciement à tous les personnels de laboratoire de notre département.

Nous remercions l'ensemble des enseignants qui nous ont transmis leur savoir tout le long de notre cycle universitaire.

Nous tenons à remercier Mr. Baitiche Saïd et tous ceux qui ont contribué de près et de loin pour l'élaboration de ce mémoire.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail A les deux êtres qui m'ont donné la vie, qui
mon vu grandir, qui m'ont transmis tout le savoir et qui était pour
moi un cour veillant pendant toute ma vie, les deux que je ne pourrais
jamais assez remercier, A ma mère Hayat et mon père Saïd.

A mes grandes mères Merbouha, Djamila et je prie de bon dieu que
leurs vie soit longue.

A mes frères : Nabil et Alla Eddine et A mes sœurs Khadija et
Salima. Pour leurs soutiens moral, leurs affections et leurs
encouragements.

A mon cher époux Hakim.

A toute ma famille grands et petits Baitiche et Zennaf.

A mes collègues de fin d'étude 2^{ème} année Master BMP.

A mes chères amies : Fadhila, Meriem, Malika, Ilham, Wided, Fatema,
Soumia, Fatima, Houda, Asma, Mounira.

Enfin A tout qui mon aidée de loin ou de près pour réaliser ce modeste
travail.

Amel.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail A mon père *Mrd Lamine* le plus adorable des papas, symbole de courage et de tendresse qui ma encouragée à aller loin dans mes études. A ma mère *Cherifa* le secret de mon existence et l'exemple de courage, de tendresse, de patience et d'amour.

A mes grands pères *Salah* et *Ali* et mes grandes mères *Laakri* et *Drahm*.

A mes frères *Raouf*, *Ali* et A ma chère sœur *Islissem* pour leurs soutiens moral, leurs affections et leurs encouragements.

A mon neveu *Nidhal*, au sourire d'ange qui me rappelle que la vie est pleine d'espoirs.

A toute ma famille grand et petit *Kafi* et *Atsamnia*.

A mes chères amies : *Nada*, *Amel*, *Ilhem*, *Meriem*, *Malika*, *Wided*, *Soumia*, *Fatima*, *Houda*, *Asma*, *Hana* et *Khalida*.

A mes collègues de fin d'étude 2^{ème} année Master *BMP*,

Enfin A tous qui mon aidée et souhaité bonne chance.

FADHILA

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01

Partie Bibliographique

CHAPITRE I : *Escherichia coli*

I- Les entérobactéries

I-1 Généralité	02
I-2 Subdivision.....	03
I-3 Le genre <i>Escherichia</i>	03
I-4 <i>Escherichia coli</i>	04
I-4-1 Historique.....	04
I-4-2 Définition	04
I-4-3 Classification	04
I-4-4 Habitat	05
I-4-5 Étude bactériologique.....	05
I-4-6 Génome	08
I-4-7 Pouvoir pathogène	08
I-4-8 Diagnostic	11
I-4-9 Antibiothérapie.....	12
I-4-10 Traitement.....	12

CHAPITRE II : Les plasmides et la Résistances aux antibiotiques.

II-1 Généralités	13
II-2 Structure moléculaire des plasmides	14
II-3 Fonction des plasmides.....	15
II-4 Propriétés codées par les plasmides	16
II-4-1 Les plasmides conjugatifs	16
II-4-2 Les plasmides de résistance.....	16
II-4-3 Les plasmides métaboliques.....	17

II-4-4 Les plasmides de virulence.....	18
II-4-5 Les plasmides de bactériocines.....	18
II-5 La réplication plasmidique.....	19
II-6 L'utilisation des plasmides.....	20
II-6-1 vecteur de clonage.....	20
II-6-2 vecteur d'expression.....	20
II-6-3 vecteur pour la transformation de cellules eucaryotes.....	20
II-7 Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	21
II-7-1 La résistance naturelle.....	21
II-7-2 La résistance acquise.....	21
 CHAPITRE III : Les échanges génétiques	
III-1 La transformation	
III-1-1 Historique.....	23
III-1-2 Définition.....	24
III-1-3 Mécanismes de la transformation.....	25
III-1-4 La transfection.....	28
III-1-5 Importance de la transformation.....	29
III-2 La Conjugaison	
III-2-1 La découverte de la conjugaison.....	30
III-2-2 Définition.....	31
III-2-3 Mécanismes de la conjugaison.....	32
III-2-4 Conjugaison sans plasmide.....	35
III-2-4 Conséquences et applications.....	36
III-3 La transduction	
III-3-1 Définition.....	37
III-3-2 Mécanisme de la transduction.....	37
III-3-3 La conversion lysogénique.....	40

Partie expérimentale

I- Matériel et méthodes	
I-1 Etude bactériologique.....	41
I-1-1 Ensemencement sur milieu de culture.....	41
I-1-2 Coloration de Gram.....	41
I-2 Examen lié aux caractères biochimiques	
I-2-1 La Galerie AP20 ^E	42
I-3 L'Antibiogramme.....	44
I-4 L'extraction de l'ADN plasmidique.....	46
I-5 L'électrophorèse.....	49
I-6 Transformation Bactérienne.....	51
II-Résultats et Discussion.....	52
Conclusion.....	59
Résumé	
Référence bibliographique	

Produced with Scantopdf

Figure	Titre	PAGE
Figures : 01	Aspect morphologique des <i>Escherichia coli</i> .	4
Figures : 02	Localisation des antigènes, O et H dans une <i>Escherichia coli</i> .	6
Figures : 03	Cartes montrant la taille et l'organisation générale du plasmide F.	14
Figures : 04	L'expérience de Griffith (1928), Avery et McLeod (1944).	23
Figures : 05	Mécanisme de la transformation naturelle chez une bactérie Gram positif.	25
Figures : 06	Mécanisme de la transformation naturelle chez une bactérie Gram négatif.	26
Figures : 07	Découverte de la conjugaison (Lederberg et Tatum 1946).	30
Figures : 08	Le Croisement $F^+ \times F^-$.	31
Figures : 09	Le Croisement $Hfr \times F^-$.	32
Figure : 10	Le Croisement $F' \times F^-$.	33
Figure : 11	La transduction généralisée par les bactériophages	37
Figure : 12	La transduction spécialisée par un bactériophage tempéré	38
Figure : 13	Aspect des colonies des <i>E. coli</i> sur Hicktoen.	51
Figure : 14	Aspect des souches <i>E. coli</i> après coloration de Gram.	51
Figure : 15	Résultat d'identification biochimique d' <i>Escherichia coli</i> par la galerie API20.	52
Figure : 16	Résultat de l'antibiogramme d' <i>E. coli</i> (1) et d' <i>E. coli</i> (2).	53
Figure : 17	Un précipité d'ADN plasmidique.	54
Figure : 18	L'observation des bandes d'ADN sous UV.	55
Figure : 19	Les résultats de test de l'antibiogramme avant et après de la transformation.	56

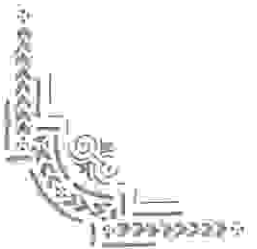
Numéro	Titre	Page
Tableau : I	Propriétés des <i>E.coli</i> responsable de diarrhées.	10
Tableau : II	Mécanismes courants de résistances aux antibiotiques codés par des plasmides.	16
Tableau : III	Les antibiotiques utilisés	44
Tableau : IV	Résultat des 10 premiers tests de la galerie AP I 20.	52
Tableau : V	Résultat des 10 derniers tests de la galerie AP I 20.	52
Tableau : VI	Résultats de teste d'antibiogramme	53
Tableau : VII	Les résultats des tests d'antibiogrammes après transformation.	56

Produced with SCANTOPDF



Produced with ScanToPDF

Introduction



Depuis l'introduction des antibiotiques dans le domaine de la médecine et le problème de la résistance des bactéries dans le milieu hospitalier aux antibiotiques à large utilisation pose toujours un problème de santé publique, surtout que cette résistance est souvent codée par des gènes portés par l'ADN plasmidique.

Ce dernier peut être transféré d'une bactérie à une autre par des différents processus qui sont : la transformation, la conjugaison et la transduction.

Dans cette optique, nous allons essayer de réaliser le transfert de caractères de résistance aux antibiotiques entre deux bactéries par la technique de transformation.

Notre étude comporte deux grandes parties :

- *Une partie théorique en relation avec le thème de notre mémoire.

- *Une partie expérimentale qui consiste à extraire l'ADN plasmidique d'une souche d'*E. coli* résistante à un ou plusieurs antibiotiques, et de transformer une autre souche, toujours d'*E. coli* sensible à ces antibiotiques. Ensuite, nous vérifions l'acquisition du caractère de résistance par la bactérie réceptrice.



Chapitre :I

Echerichia .coli

Produced with ScantOPDF



I- Les entérobactéries

I-1 Généralités :

Entérobactéries ou entérobactériaceae sont comme leur nom l'indique, des microbes commensaux de l'intestin humain et animal, présents tout particulièrement dans le colon et le rectum, jouant un rôle dans les phénomènes digestifs.

Toutes les bactéries appartenant à cette famille ont en commun les caractères suivants :

- Bacilles à gram négatif.
- Ayant un diamètre variant de 1 à 2 μ m et une longueur d'environ 3 à 10 μ m.
- Immobiles ou mobiles mais dans ce cas grâce à une ciliature péritriche.
- Se développant aisément sur milieux ordinaires.
- Aéro-anaérobies facultatifs.
- Faisant fermenter le glucose avec ou sans production de gaz.
- Oxydase-négatif, catalase positif.
- Réduisant les nitrates en nitrite (à quelques exceptions comme *Erwinia*).
- Peuvent être capsulés, elles ne sont jamais sporulés.

Le domaine des entérobactéries ne se limite pas à l'intestin, on les trouve ainsi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux.

Les entérobactéries peuvent subsister en dehors d'organismes vivants, on les rencontre dans le sol, l'eau, un certain nombre de denrées alimentaires (produits laitiers surtout) et des végétaux qui sont l'habitat habituel de certaines espèce ou genre comme : *Entérobacter agglomerans* ou *Erwinia*.

La plupart des entérobactéries (et tout particulièrement les coliformes) sont capables de s'y multiplier, de façon autonome pendant une période illimitée : c'est ainsi que dans le sol, elles participent aux cycles de carbone et de l'azote. (Pilet C et al., 1987 ; Nauciel CH et al., 2005).

I-2 Subdivision :

La famille des entérobactéries regroupe différents genres :

A-Certains genres sont anciennement décrits et les plus souvent rencontrés en pathologie, sont :

- Escherichia, Shigella.*
- Salmonella, Arizona, citrobacter.*
- Proteus, providencia, morganella.*
- klebsiella, enterobacter, serratia (groupe(KES), hafnia.*
- Yersinia, edwardsiella,*

B-D'autres genres, plus récemment décrits sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolé chez l'homme: *butiauxella, moellerella, absymbacterium, rhanella, tatumella, trabulsiella, xenorhadus, yokenella.*

Escherichia est très étudié car il contient des espèces saprophytes et aussi des espèces pathogènes. (Boulabral F., 2002).

I-3 Le genre *Escherichia* :

Escherichia est un genre de bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, qui colonise l'intestin de l'homme et d'autres animaux. Il comprend cinq espèces : *E. coli, E.fergusonii, E.hermannii, E.vulneris,* et une espèce très rare isolé des blattes: *E. blattae.*

Ces espèces se différencient sur la base de l'hybridation ADN/ADN et par leurs caractères biochimiques respectifs.

Escherichia coli est actuellement la seule espèce homologuée de ce genre. (Le Minor et vero., 1982 ; 1989. In Aouissi A). [7].

I-4 Escherichia coli

I-4-1 Historique:

Escherichia coli fut initialement isolé et décrite par le pédiatre allemand Théodore Escherich, en 1885. Celui-ci démontra son existence comme hôte normal de l'intestin de l'enfant et pour marquer à la fois ce tropisme et la fréquence de son isolement, l'appela *Bacterium coli commune*, ce que l'on peut traduire par «bactérie commune du colon».

C'est en 1919 que Castelan et Chalmers lui donnent son nom définitif en hommage à Escherich, *Escherichia* est ensuite devenu le genre-type de la famille des Enterobacteriaceae et *E. coli* l'espèce type de ce genre. [6].

I-4-2 Définition :

Escherichia coli, également appelé colibacille ou *E. coli*, est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain, généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies.[6].

I-4-3 Classification :

- Règne : Procaryotae.
- Domaine : Bacteria.
- Phylum : Proteobacteria.
- Classe : Gammaproteobacteria.
- Ordre : Enterobacteriales.
- Famille : Enterobacteriaceae.
- Genre : Escherichia.
- Espèce: Escherichia coli. [5],[1].

I-4-4 Habitat :

E. coli est une entérobactérie commensale du tube digestif. Elle représente près de 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte, on peut la retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez l'animal.

La colonisation du tube digestif commence dès les premières heures après la naissance et le rythme de division (une division toute les 20 minutes à 37°C et en condition favorable) lui permet de garder pendant toute la vie de l'individu sa place dominante dans la flore.

Sa présence dans le milieu environnant (eau, sol) ou dans les aliments signe une contamination fécale. (Carip C., 2008 ; Ferron A., 1984).

I-4-5 Étude bactériologique :

A- Caractères morphologiques :

- Ceux sont des bacilles à gram négatif de 2µ à 3µ de long sur 0.7µ de large.
- Ils se présentent soit seuls ou groupés le plus souvent par deux (diplobacilles), plus rarement ils sont rencontrés en amas.
- Ils sont en mobilité positive grâce à une ciliature péritriche, mais très réduite. Sauf le sérotype 0:111 qui est immobile (Fig.01).
- Des formes capsulées ont été rencontrées, avec présence de l'antigène A. [2].

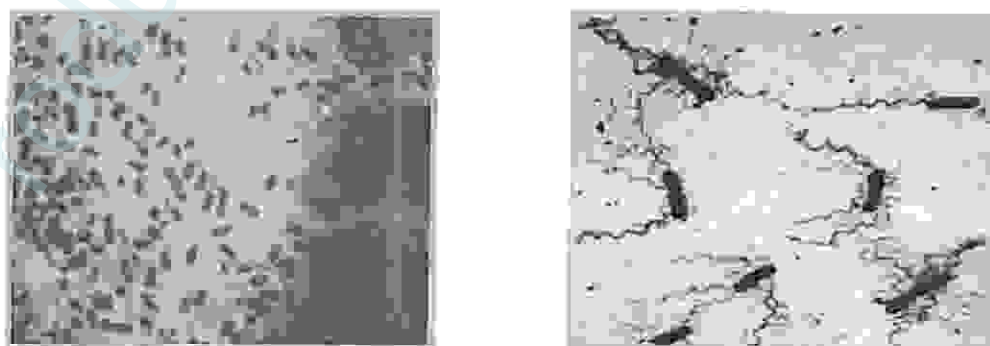


Fig. 01 : Aspect morphologique d'*Escherichia coli*. [2].

B- Caractères culturaux :

- *E. coli* se développe sur gélose ordinaire.
- Aéro-anaérobie facultatif.
- pH optimum : 7,5.
- Température : 37°C (mais pousse entre 15°C et 45°C). [5].

C- Caractères biochimiques :

- Fermente le glucose habituellement avec production de gaz .
- Réduit les nitrates en nitrites
- rouge de méthyle (+), lactose (+), ONPG (+), mannitol (+), Indole (+) saccharose (+), salicine (+).
- uréase (-), acétoïne (-), citrate (-), VP (-), H₂S (-), désaminase (-), citrate de Simmons(-).

On peut rencontrer des variants négatifs pour un caractère habituellement positifs, ceci est consécutif à une mutation. A l'inverse on peut exceptionnellement rencontrer des variants positifs pour un caractère habituellement négatif, ce caractère peut être codé par un plasmide dont l'existence a été montrée dans certains cas. (le Minor L et *al.*, 1982 ; Carip C., 2008).[5],[1].

D- Caractères antigéniques :

Les principaux antigènes d'*Escherichia coli* sont :

D -1 Les antigènes O :

Ils possèdent une composition lipopolysaccharidique très complexe. Chaque antigène O permet de définir un sérotype O correspondant, grâce à des réactions d'agglutination. Les antigènes O sont particulièrement importants car ils conditionnent le pouvoir pathogène des souches ainsi que l'immunité conférée (Fig.02).

On a dénombré jusqu'à présent 163 antigènes O différents, allant d'O₁ jusqu'à O₁₆₃. (Pilet C et *al.*, 1987).

D-2 Les antigènes K:

Les antigènes K décrits par Kauffinan et coll (1986) masquent les antigènes O et rendent certaines souches d'*Escherichia coli* inagglutinables.

On distingue 3 catégories d'antigène K en fonction de leur propriétés : L, A, B.

D-2-1 L'antigène L : Le plus fréquent, c'est un antigène de surface. Il est thermolabile (détruit en 30 minutes à 100°C). Le chauffage par conséquent provoque la perte du pouvoir antigénique.

D-2-2 L'antigène A : est beaucoup plus rare ; c'est un antigène capsulaire, rencontrés chez les *Escherichia coli*, responsables d'infections urinaires. Il est thermostable et n'est détruit que par autoclavage.

D-2-3 L'antigène B : est rencontré chez les souches d'*Escherichia coli* responsables de gastro-entérite infantile. Il est thermolabile et détruit en 30 mn à 100°C.

On distingue actuellement 93 antigènes K de structure polysaccharidique. [5],[1].

3 - Les antigènes H:

Ils sont au nombre de 56, ils sont très difficiles à mettre en évidence. Ces antigènes, ne servent pas à l'identification des *Escherichia coli* pathogènes, mais ont un intérêt du point de vue épidémiologique (Fig.02).

La diversité des antigènes H est due aux différents type de flagelline. [5].

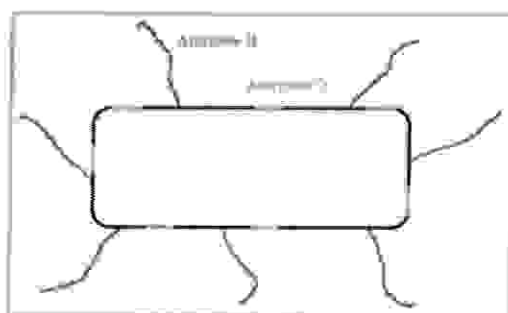


Fig.02: Localisation des antigènes, O et H dans une *Escherichia coli*. [2].

1-4-6 Génome :

Le génome d'*E. coli* a été beaucoup étudié et entièrement déchiffré. Les types des bactéries ont seulement 40% de leurs gènes en commun ce qui témoigne d'une variabilité et d'une adaptabilité très importante.

Les différents gènes de virulence acquis pendant l'évolution entraînent une grande diversité des infections induites.

La bonne connaissance de son génome et sa grande souplesse ont fait d'*E. coli* l'outil le plus utilisé en génie génétique. Des fragments d'ADN peuvent y être introduits par un vecteur (plasmide, bactériophage...) et insérés dans le chromosome bactérien. La facilité de culture et la vitesse de croissance permettent ensuite de cultiver et de multiplier les bactéries, soit pour isoler le gène voulu (amplification biologique), soit pour récolter le produit de synthèse cellulaire lié à ce gène (enzyme, hormone). (Carip C., 2008).

1-4-7 Pouvoir pathogène

1-4-7-1 Infection extra-intestinales :

E. coli est responsable d'infection diverses :

A- **Infection urinaires** : la majorité des infections urinaires est due à *E. coli* : infection ascendante ou descendante, vésicule et rénale.

B- **Infection abdominales** : se sont des cholécystes, péritonites ou salpingites.

C- **Infection méningées** : les méningites néonatales sont souvent graves (80% des souches possèdent l'antigène capsulaire k1).

D- **Les bactériémies**: consécutives à une infection localisée peuvent évoluer vers un choc septique gravissime due à l'action du lipopolysaccharides ou endotoxines. (Fauchère J-L et Avril J-L., 2002 ; Ferron A., 1984).

1-4-7-2 Infection intestinales ou entériques :

Les *E. coli* entériques ou intestinaux sont responsables de gastro-entérites infantiles ou de diarrhée des voyageurs. Leur particularité commune est la capacité d'adhérer à la surface des entérocytes par des pili. (Carip C, 2008).

Selon les facteurs de virulence exprimés et le mode d'interaction cellulaire (adhésion, invasion, production de toxine), la maladie revêt divers aspects syndromes cholériforme, syndrome dysentérique, diarrhées sanglantes, diarrhées aiguës ou persistantes.

Plusieurs types peuvent être distingués selon le mécanisme pathogène :

A- *E. coli* entérotoxigène (ETEC) :

Sont après les rotavirus, les principaux micro-organismes responsables de diarrhée dans les pays en voie de développement notamment chez les enfants de moins de trois ans, et sont également responsables de la diarrhée du voyageur. La contamination est principalement due à l'ingestion d'eau souillée.

Les bactéries se multiplient au niveau de l'intestin grêle des sujets infectés et entraînent l'apparition d'une substance aqueuse, accompagnée de crampes abdominales. L'intensité de l'infection peut se traduire par un simple désordre transitoire ou un syndrome cholériforme.

B- *E. coli* entérotoxigène (EPEC) :

Certaines épidémies de gastro-entérites sont dues à des sérotypes particuliers dits

E. coli GEI ou entérotoxigènes (EPEC).

Il existe 12 variétés :

1^{er} groupe : O₁₁₁, O₅₆, O₂₆ plus fréquent.

2^{ème} groupe : O₈₆, O₁₁₇, O₁₂₇.

3^{ème} groupe : O₁₂₅, O₁₂₆, O₁₂₈.

4^{ème} groupe : O₁₂₄, O₁₁₄, O₁₄₂ rare en Europe. (Joffin J-J-N. et al., 2001).

Ces bactéries sont également à l'origine de diarrhée aqueuse profuse souvent accompagnée de vomissement et parfois de fièvres avec une période d'incubation relativement courte (3h lors d'expériences chez des volontaires sains). Ces infections surviennent essentiellement chez les nourrissons (moins de 6 mois) dans les pays en voie de développement.

C- *E. coli* entéroinvasives (EIEC) :

Se caractérise par un syndrome dysentérique. En effet, ces bactéries induisent une importante réaction inflammatoire au niveau du colon ce qui se traduit par l'apparition de selles sanglantes, muqueuse et renfermant quelque fois du pus.

D- *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) :

Reconnus comme pathogène pour l'homme qu'au début des années 80, engendrent diverses manifestations cliniques : diarrhées par des crampes abdominales sévères et une diarrhée sanglante. L'état général peut s'aggraver et évoluer vers un syndrome d'urémie hémolytique caractérisé par une insuffisance aiguë. L'alimentation d'origine animale semble être la source principale de contamination humaine. (Sansoneffi, 1989, Forestie et al, 1998, germani et sansoneffi, 1999, In Amina).

E- *E. coli* entéroaggrégatif (EAggEC) :

Ces souches sont responsables de diarrhées persistantes chez des enfants dans les pays sous développés. Cette adhésion est à l'origine de nécrose du pôle apical des villosités avec œdème et hémorragies dans la sous muqueuse. Ces souches produisent une entérotoxine thermostable et une hémolysine thermolabile (Tab. 1). (Fauchère J-L et al., 2002).

Tab. I : Propriétés des *E. coli* responsables de diarrhées (Avril et al., 2000 .In Amina).

Diarrhée	Aigue et chronique	sanglante	liquide	Dysentérique
Cible	Enfant moins de 1 an	Intoxication alimentaire	Enfant et voyageurs	Adultes et Intoxication alimentaire
Sérotype	O ₂₆ , O ₅₅ , O ₆₆ , O ₁₁₁ , O ₁₁₄ , O ₁₁₇ , O ₁₂₅ , O ₁₂₆ , O ₁₃₇ , O ₁₃₈ , O ₁₄₁	O ₁₅₇	O ₅ , O ₆ , O ₁₅ , O ₂₀ , O ₂₅ , O ₂₇ , O ₆₃ , O ₇₈ , O ₈₅ , O ₁₁₅ , O ₁₂₈ , O ₁₄₈ , O ₁₅₉	O ₂₆ , O ₁₁₂ , O ₁₂₄ , O ₁₃₆ , O ₁₄₅ , O ₁₄₄ , O ₁₄₇ , O ₁₅₂ , O ₁₆₄
Mécanisme	Adhérence	Pas invasif	Attachement	Envahissement
Plasmide	Oui	Oui	Oui	Oui
Toxines	dysentérique	dysentérique	Toxine thermolabile/ toxine thermostable	dysentérique
taille	55-75 Md	30-75 Md	-	140 Md

I-4-8 Diagnostic :

C'est un diagnostic bactériologique direct avec recherche du germe dans le sang, les urines, le liquide céphalo-rachidien. L'isolement est suivi d'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Dans les selles où la flore aérobie est constituée essentiellement par les colibacilles, la recherche de souches pathogènes spécifiques est fondée sur la recherche d'antigènes particuliers aux colibacilles entéro-pathogène ou la recherche des colibacilles entéro-toxinogène.

Ces recherches sont basés sur des méthodes phénotypiques (caractérisation des adhésines, des

toxines), ou des méthodes génotypiques (détection des gènes d'intérêt par hybridation avec des sondes spécifiques ou par PCR).

Dans les infections urinaires, la mise en évidence d'anticorps sériques et la recherche d'anticorps fixés sur les bactéries urinaires ont été proposés permettant de distinguer les localisations hautes ou basses de l'infection. Ces techniques sont d'interprétation délicate. (Nauciel CH. et al 2005 ; Ferron A., 1984).

I-4-9 Antibiothérapie :

L'espèce *E. coli* reste dans l'ensemble sensible aux principaux antibiotiques tels que l'ampicilline, les céphalosporines, les aminosides, la colistine, les tétracyclines et le triméthopime-sulfaméthoxazole. Cependant un certain nombre de souches peuvent acquérir de multiples résistances aux antibiotiques. (Berche et al, 1988 in aoussi A).

I-4-10 Traitement :

I-4-10-1 Traitement préventif :

Il concerne surtout la prophylaxie des diarrhées épidémiques et repose sur des mesures d'hygiène.

I-4-10-2 Traitement curatif :

E. coli est habituellement sensible aux ATB actifs sur les bacilles à gram négatif. Leur choix sera fonction de la localisation de l'infection et par conséquent des propriétés pharmacocinétiques et de la notion de la résistance acquise. (Ferron A., 1984).



Chapitre :II

les plasmides et la résistance aux antibiotiques

Produced with Scantopdf



II-Les Plasmides

II-1 Généralités :

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

Les plasmides sont des molécules circulaires ou linéaires (chez quelques espèces bactériennes telles que *Streptomyces* sp. *Borrelia burgdorferi*) d'ADN double brin, qui se répliquent de façon autonome par rapport au chromosome. Ils portent généralement des gènes qui ne sont pas essentiels pour la survie de la cellule, sauf dans des conditions exceptionnelles. Par exemple, les gènes de résistance aux antibiotiques.

Ils sont variables de taille de quelques centaines à plusieurs milliers de paires de base. Certains grands plasmides présents chez certaines espèces du genre *Rhizobium* peuvent être considérés comme des mini chromosomes. Bien que de nombreux plasmides existent à l'état monocopie dans une cellule bactérienne, certains sont présents en plusieurs exemplaires pouvant aller jusqu'à 20 ou 30 copies par cellule.

Plusieurs plasmides différents peuvent coexister dans une même cellule sous condition de leur compatibilité mutuelle. Certains plasmides peuvent s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule-hôte où il peut rester intact pendant de longues périodes, et se réplique à chaque division cellulaire de l'hôte. On les appelle **épisomes**.

La majorité, mais non la totalité des plasmides, peut être transférer d'une bactérie à une autre par un processus appelée conjugaison. Généralement seuls des membres très proches d'un genre bactériens peuvent échanger des plasmides, mais certains plasmides qu'on peut qualifier d'ubiquitaires peuvent être transférés à des bactéries phylogénétiquement éloignées. (Primrose S .et al., 2004).

II-2 Structure moléculaire des plasmides :

Les plasmides bactériens ont une organisation génétique modulaire, chaque module étant un segment d'ADN porteur d'un gène ou d'un groupe de gènes et de sites agissant en cis qui confèrent une propriété particulière au plasmide ou à la cellule hôte.

Un groupe de gènes et de sites absolument essentiels, **rep**, effectue et contrôle la réplication du plasmide. Il occupe une région relativement restreinte 2 à 3 kb et parfois moins, comme chez colE1, le facteur sexuel F d'*E. coli* contient deux modules **rep** fonctionnels et un troisième qui est inactivée par une insertion ainsi que deux origines de réplication végétative F comporte donc plusieurs réplicon.

Un autre type de module, **tra**, est responsable du transfert conjugatif. chez F et R100, deux plasmides conjugatifs dans les quels tra représente un tiers du plasmide et contient au moins 25 gènes.

D'autres modules confèrent la résistance à des ATB ou à des métaux lourds.

Beaucoup de plasmides contiennent des éléments génétiques transposables :

- F contient deux copies d'IS3, une d'IS2 et le transposon Tn100 (Fig.03).
- R100 contient deux copies d'IS1 et le transposon tn 10 qui contient lui même un gène de résistance à la tétracycline.

Le petit plasmide colE1 porte un gène codant pour la colicine E1, une bactériocine et un autre conférant l'immunité vis-à-vis de celui-ci. ColE1 n'est pas un plasmide conjugatif, mais il contient les gènes **mob** qui lui permettent d'être mobilisé par un autre plasmide conjugatif présent dans la cellule et d'être transféré dans une bactérie réceptrice. (Cunin R., 1993).

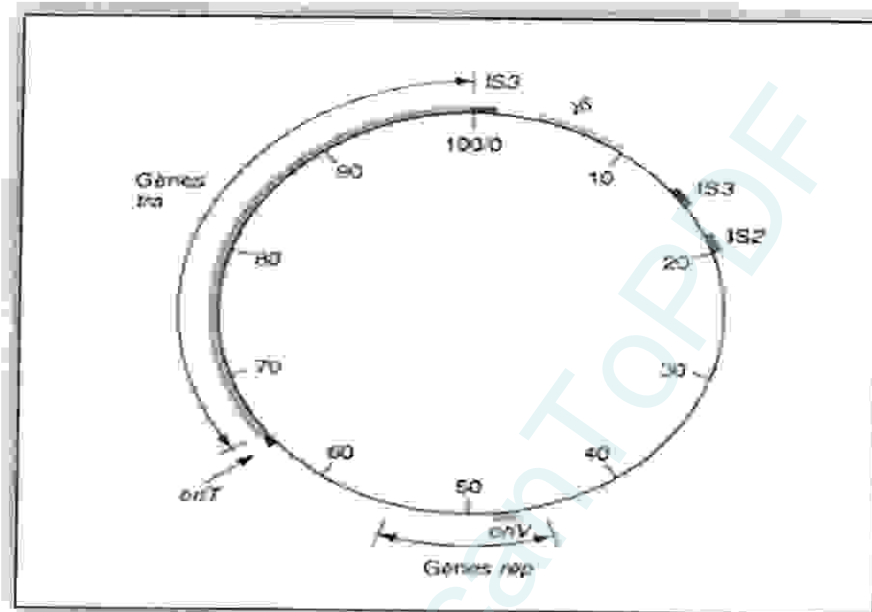


Fig.03 : Cartes montrant la taille et l'organisation générale du plasmide F. (Prescott L. M. *et al.*, 2003)

II-3 Fonction des plasmides :

Les plasmides portent souvent des gènes utiles aux bactéries mais non essentiels à la croissance normale et à la division de la cellule.

Un grand nombre de plasmides sont isolés à partir des bactéries et semblent ne pas avoir de fonction. Ces plasmides sont appelés plasmides cryptiques. (Nicklin J., 2000).

II-4 Propriétés codées par les plasmides :

II-4-1 Les plasmides conjugatifs :

Les plasmides conjugatifs sont les premiers plasmides qui ont été découverts chez la bactérie *Escherichia coli* dans les années 1950. On les appelle aussi facteurs de fertilité ou plasmides F. Ces plasmides confèrent à la bactérie hôte la capacité de synthèse de pili sexuels, où la bactérie porteuse peut transférer une copie du plasmide F par processus de conjugaison bactérienne. Ils possèdent au minimum une origine de répllication et tous les gènes nécessaires à la synthèse des pili et du transfert du plasmide. Certains de ces plasmides sont des épisomes. [4].

II-4-2 Les plasmides de résistance :

Les plasmides de résistance, appelés aussi plasmides ou facteurs R, codent des résistances aux antibiotiques et aux métaux lourds, ont été découverts en 1959, au Japon où on a retrouvé chez les malades atteints de dysenterie bactérienne, une insensibilité à tout traitement antibiotique dont la bactérie responsable *Shigella dysenteriae* portait des gènes de résistance à plusieurs antibiotiques. Par la suite, on en a retrouvé chez d'autres bactéries (comme *E. coli*) et on a appelé ces plasmides R.

Ils peuvent protéger la cellule par différents moyens :

- La synthèse d'une protéine de résistance à la substance toxique qui va neutraliser en la dénaturant, hydrolysant l'activité toxique de la substance.
- Modifier les propriétés d'enveloppe de la cellule et la rendre imperméable à la substance toxique (comme c'est le cas pour les métaux lourds).
- Coder pour des protéines qui modifier la cible moléculaire de l'antibiotique. [4].

Tab. II : Mécanismes courants de résistances aux antibiotiques codés par des plasmides. (Perry J- J et al., 2004).

Antibiotique	Mécanisme de résistance
B-lactamases	Synthèse de B-lactamases, enzymes qui détruisent l'antibiotique par hydrolyse.
Chloromaphénicol	Synthèse d'une enzyme qui inactive l'antibiotique en l'acylant.
Aminoglycosides	Synthèse d'une ou de plusieurs enzymes qui inactivent l'antibiotique par acétylation, phosphorylation ou adénylation.
Tétracycline	Synthèse d'une protéine membranaire capable de transporter l'antibiotique à l'extérieur de la cellule avant qu'il n'agisse au niveau des ribosomes.
Erythromycine	Synthèse d'une enzyme qui méthyle l'ARN ribosomique 23S, ce dernier ne peut ainsi plus se lier avec l'antibiotique.
Triméthoprim	Apparition d'un mutant triméthoprim, forme insensible de la dihydrofolate réductase.

II-4-3 Les plasmides métaboliques :

Certaines fonctions métaboliques peuvent également être codées par des plasmides, comme la biodégradation de molécules organiques complexes chez certaines espèces de *pseudomonas*.

De grands plasmides codent pour des voies métaboliques de dégradation de composés aliphatiques ou aromatiques tels que le toluène, le benzène, le naphthalène, les octanes, l'acide chlorobenzoïque et les décane ont été décrits ces dernières années.

De tels plasmides permettant à la bactérie d'utiliser des composés organiques comme seule source de carbone et d'énergie. [4].

II-4-4 Les plasmides de virulence :

Les plasmides de virulence portent des gènes codant des facteurs de virulence, ayant un rôle dans le pouvoir pathogène des bactéries. Par exemple l'*Escherichia coli* entérotoxigéniques (ETEC) responsables de la diarrhée du voyageur hébergent au moins deux plasmides, l'un portant les gènes codant un facteur de colonisation, l'autre codant des toxines.

Certains plasmides codent des facteurs tumorigènes ; c'est le cas pour la « galle du collet » due à un plasmide Ti (*tumor inducing*) hébergé par les bactéries du genre *Agrobacterium*. [4].

II-4-5 Les plasmides de bactériocines :

Ces plasmides codent la synthèse d'une protéine extracellulaire dont la biosynthèse est létale pour la bactérie productrice ainsi que pour les autres bactéries non-productrices environnantes. Cependant, ces plasmides codent aussi une deuxième protéine intracellulaire de résistance à cette première toxine.

Chez *E. coli*, on trouvera différentes catégories de bactériocines (colicines codées par les plasmides *col*). Par exemple le gène *colE1* qui code une endonucléase et le gène *colE3*, qui code une ribonucléase destinée à inactiver les ribosomes. [4].

II-5 La réplication plasmidique :

La réplication des plasmides est généralement réalisée par les enzymes cellulaires. De ce fait, les gènes portés par le plasmide lui-même concernent principalement le contrôle du processus d'initiation de la réplication et la réparation entre les cellules filles des plasmides répliqués.

La plupart des plasmides des bactéries Gram négatif se répliquent à la façon des chromosomes. Ceci implique l'initiation à une origine de réplication et une réplication bidirectionnelle autour du cercle, conduisant à un intermédiaire θ . Cependant, certains plasmides ont une réplication unidirectionnelle.

Du fait de la petite taille de l'ADN plasmidique comparé au chromosome, le processus entier de réplication se fait rapidement, ce qui correspond peut être à un dixième ou moins encore du temps total du cycle de division cellulaire.

La majorité des plasmides des bactéries Gram positif se répliquent par le mécanisme du cercle roulant. Ce mécanisme conduit à un intermédiaire simple brin.

La plupart des plasmides linéaires se répliquent en utilisant un mécanisme impliquant une protéine amorce liée à l'extrémité 5' de chaque brin et qui est utilisée dans l'initiation de la synthèse de l'ADN. (Mardigan M et al 2007).

II-6 L'utilisation des plasmides :

II-6-1 Vecteur de clonage :

Par des expériences de recombinaison *in vitro*, on sait intégrer dans un plasmide un fragment d'ADN provenant d'une autre source, on obtient ainsi un plasmide recombiné ou plasmide chimère. On peut faire pénétrer ces molécules recombinées dans des cellules dépourvues de plasmide (transformation bactérienne).

On peut cribler les cellules qui ont reçu une molécule de plasmide grâce aux gènes du plasmide qui sont sélectionnables (résistance à un antibiotique par exemple). Parmi ces cellules, on pourra reconnaître (ou sélectionner) celles qui portent un plasmide ayant intégré un fragment particulier de l'ADN étranger.

L'ensemble des descendants d'une telle cellule constitue un clone. On dit que l'on a cloné un fragment d'ADN. Ce fragment sera beaucoup plus facile à obtenir, à purifier, et à étudier dans un clone bactérien.

II-6-2 Vecteur d'expression :

Une fois un fragment d'ADN cloné dans un plasmide on peut réussir à faire exprimer les gènes qu'il porte dans les cellules bactériennes (*Escherichia coli*). Cette expression nécessite la transcription de ce fragment et la traduction du message. On peut ainsi faire fabriquer des protéines étrangères (par exemple l'insuline humaine, l'hormone de croissance humaine).

II-6-3 Vecteur pour la transformation de cellules eucaryotes :

On sait depuis quelques années introduire et faire exprimer de l'ADN dans des cellules eucaryotes (levure, cellules de Mammifères en culture, cellules résultant des premières divisions de l'œuf d'un mammifère par exemple). On peut ainsi, après un clonage dans des cellules bactériennes, réintroduire le gène cloné dans des cellules eucaryotes et le faire exprimer. [4].

II-7 Résistance bactérienne aux antibiotiques:

Les mécanismes génétiques et biochimiques, responsables de la résistance des bactéries aux antibiotiques, permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de la résistance (apparition et diffusion des gènes de résistance et des souches résistantes) et de mieux appréhender les facteurs responsables de la sélection des souches résistantes.

Sur le plan génétique, la résistance des bactéries aux antibiotiques résulte soit d'une résistance naturelle soit d'une résistance acquise.

II-7-1 La résistance naturelle :

On peut parler de résistance naturelle si toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Elle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques.

Exemple : Les bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) sont naturellement résistants, le plus souvent à bas niveau, aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M...) car ces antibiotiques ne peuvent traverser la membrane externe de la paroi.

On rencontre ce type de résistance chez les souches sauvages, n'ayant jamais été en contact avec un antibiotique.

II-7-2 La résistance acquise :

La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique permettant à une bactérie de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce.

II-7-2-1 Mécanismes génétiques de la résistance acquise :

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides et ils définissent une résistance extra-chromosomique.

➤ Chromosomique:

La résistance acquise survient lorsque quelques souches d'une même espèce normalement sensibles deviennent résistantes. Cette résistance peut-être acquise par mutagenèse.

Le phénomène de mutation est spontané avec une fréquence d'apparition de 10^{-6} à 10^{-7} . C'est un événement rare.

L'antibiotique n'est pas l'agent mutagène, il sélectionne seulement les mutants devenus résistants. Cela peut conduire à la résistance à toute une famille d'antibiotiques.

➤ Plasmidique:

La résistance plasmidique est liée à la synthèse des protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie.

Les bactéries ont la capacité de transférer l'information génétique contenue sur le plasmide. La plupart de ces cas de résistances se rencontrent à l'hôpital.

Souvent les bactéries ont rassemblé plusieurs gènes de résistance sur leur plasmide et l'échangent. [3].



Chapitre III

Les échanges génétiques



La bactérie peut être l'objet de variations génétiques autres que la mutation. Celles-ci peuvent résulter du transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre par des processus aussi différents que la transformation, la transduction et la conjugaison. [8].

III-1 La transformation

III-1-1 Historique :

Les premières preuves sur la transformation bactérienne ont été obtenues par le scientifique britannique Frederick Griffith à la fin des années 1920. Il travaillait sur *Streptococcus pneumoniae* (le pneumocoque), une bactérie qui doit en partie sa capacité invasive à la présence d'une capsule polysaccharidique. Des mutants sans capsule peuvent être isolés, ils sont alors incapables de causer une infection, ces mutants sont appelés les souches R, car leurs colonies apparaissent rugueuses (*rough*) sur la gélose, au contraire de l'apparence lisse des souches encapsulées, appelées souches S (*smooth*).

Une souris infectée avec des cellules d'une souche S succombe au bout d'un ou deux jours à une infection massive de pneumocoque. A l'opposé, l'injection des cellules R ne cause pas la mort.

Griffith a montré que si des cellules S tuées par la chaleur sont injectées avec des cellules R vivantes, la souris développe une infection qui lui est fatale et la bactérie isolée de la souris morte est du type S. Griffith a conclu que les cellules R avaient été transformées en un nouveau type. (Fig.04).

En 1944, Avery, Macleod et McCarthy ont montré que la possibilité de transformer une souche avirulente de *S. pneumoniae* en souche virulente, par une solution d'ADN de souche virulente, était perdue quand cette solution était soumise à l'action d'ADNase. De tels résultats ont prouvé que l'information génétique transmise par transformation, était portée par l'ADN et non par les protéines ou l'ARN. (Mardigan M et al., 2007 ; Perry J.J. et al., 2004).




















n°	expériences	étude de survie	analyse de sang de la souris	
1	 Pneumocoques S vivants	 pneumocoques S vivants	 mort	 présence de très nombreux pneumocoques S vivants
2	 pneumocoques R vivants	 pneumocoques R vivants	 vivante	absence de tout pneumocoque
3	 capsule déviable pneumocoques S tués	 pneumocoques S tués	 vivante	absence de tout pneumocoque
4	 pneumocoques S tués + pneumocoques R vivants	 pneumocoques S tués + pneumocoques R vivants	 mort	présence de très nombreux pneumocoques S vivants
5	 pneumocoques S tués et ADN R purifié ADN R purifié + pneumocoques R vivants	 pneumocoques S tués et ADN R purifié	 vivante	absence de tout pneumocoque
6	 pneumocoques R vivants + ADN S purifié ADN S purifié + pneumocoques S	 pneumocoques R vivants + ADN S purifié	 mort	présence de très nombreux pneumocoques S vivants

Fig.04 : L'expérience de Griffith (1928), Avery et McLeod (1944). [11].

III-1-2 Définition :

La transformation est le premier modèle connu de transfert de matériel génétique au cours duquel l'ADN bicaténaire, libre, nu et en solution est fixé puis absorbé par des bactéries réceptrices ou en état de compétence. Cette absorption entraîne après recombinaison de nouveaux caractères génétiques donc stables et transmissibles. (Ferron A., 1984).

La fréquence de transformation pour des cellules très compétentes se situe aux environs de 10^{-3} pour la plupart des espèces lorsqu'il y a un excès d'ADN. (Prescott L M et al., 2003), [10].

III-1-3 Mécanismes de la transformation :

III-1-3-1 Transformation naturelle (physiologique) :

Jusqu' à présent, on a mis la transformation naturelle en évidence chez un certain nombre de genres bactériens: *Streptococcus*., *Staphylococcus*., *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*., *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonase*, *Thermus* et *Azotobacte*. (Prescott L M et al., 2003. Mardigan M et al., 2007).

Cette transformation mis en jeu un ensemble de mécanismes variables selon les germes Gram positifs et Gram négatifs. (Ferron A., 1984).

A-Chez les bactéries à Gram positif :

L'état de compétence nécessite l'apparition à la surface de la cellule d'un complexe protéique constitué d'une endonucléase, d'une exonucléase et d'une protéine membranaire fixant l'ADN, une autolysine de la paroi cellulaires qui augmente la perméabilité.

Le mécanisme a été fort étudié chez *S. Pneumoniae* et passe par les étapes suivantes :

- Une cellule compétente lie un fragment d'ADN double brin de taille moyen ; le processus se fait au hasard puisque tous les fragments du donneur sont en compétition entre eux. La capture de l'ADN demande de l'énergie.
- L'ADN est ensuite clivé par une endonucléase en fragments doubles brins d'environ 15 kilobases.
- L'exonucléase dégrade l'un des deux brins d'ADN alors que le deuxième brin pénètre dans le cytoplasme.

L'ADN peut alors être dégradé par les enzymes cellulaires ou, s'il est très proche de l'ADN chromosomique, il peut être utilisé par les enzymes de réparation de l'ADN pour être recombiné avec le chromosome, (Fig .05). (Prescott et al., 2003). [9].

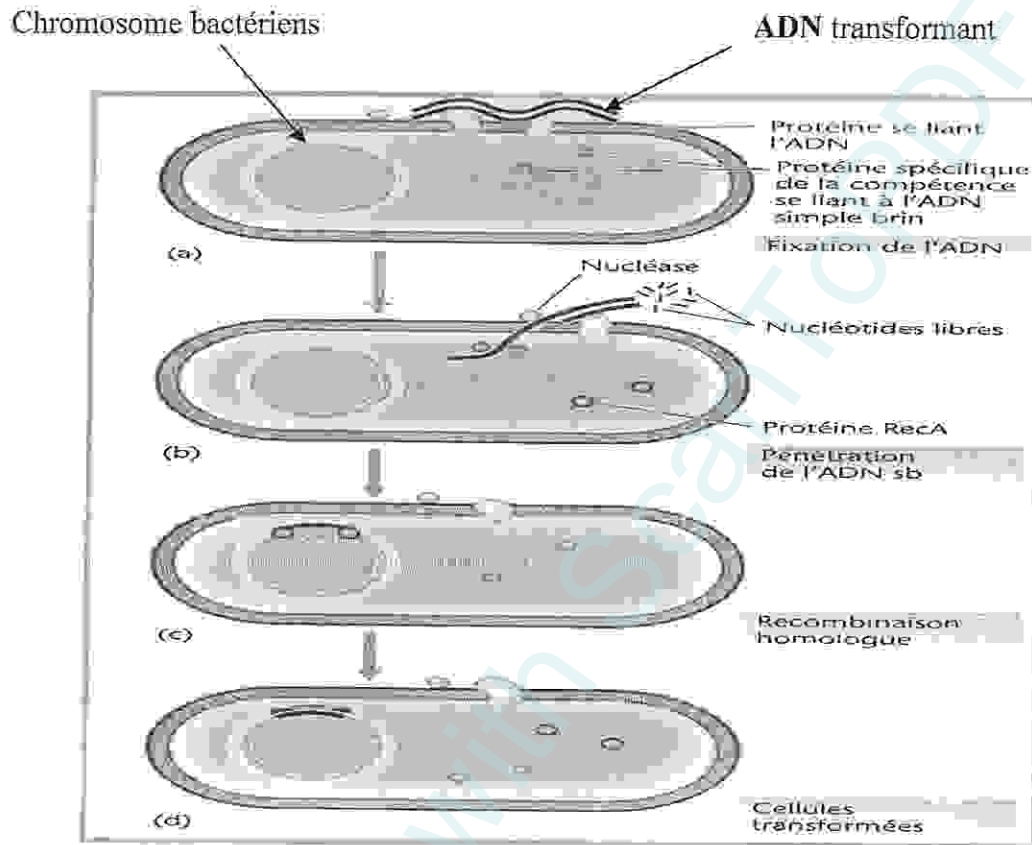


Fig.05 : Mécanisme de la transformation naturelle chez une bactérie Gram positif (Mardigan M et al., 2007)..

B- Chez les bactéries à Gram négatif :

Les mécanismes sont proches, mais il existe deux différences essentielles :

- L'état de compétence et la capture de l'ADN sont associés à la présence de petites vésicules membranaires, appelées transformasomes, et qui font saillie à l'extérieur de la cellule. L'ADN transformant est capturé par ces vésicules et il est transporté dans l'espace périplasmique dans lequel il est dégradé et un unique brin d'ADN gagne le cytoplasme avant d'être incorporé au chromosome. (Fig.06).

- La capture de l'ADN exogène nécessite la reconnaissance de séquences spécifiques de 10 à 11 Pb. Par exemple, la séquence AAGTGCGGTCA pour *Haemophilus influenzae* ou la séquence GCCGTCTCAA pour *Neisseria gonorrhoeae*. Des séquences d'une telle longueur ont peu de chance d'être présentes sur de nombreuses molécules d'ADN cela veut dire que seul des ADN spécifiques peuvent être transformants. [9].

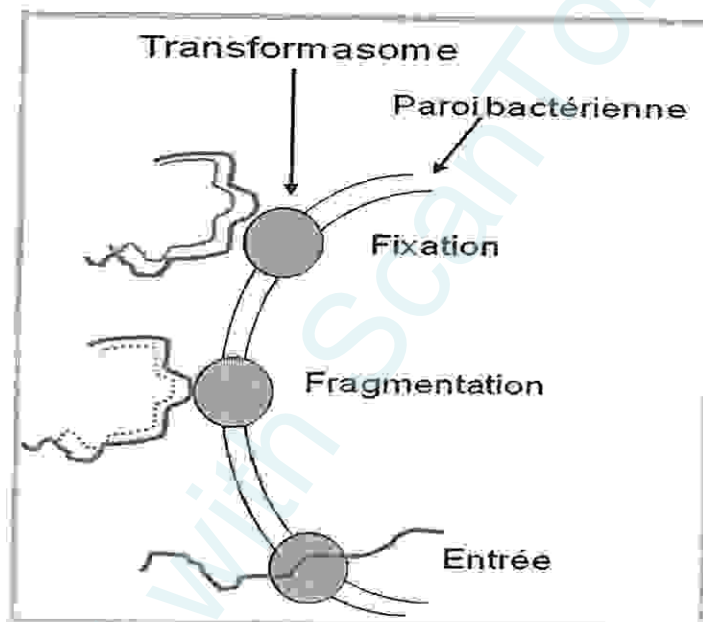


Fig.06 : Mécanisme de la transformation naturelle chez une bactérie Gram négatif. [19].

II-1-3-2 Transformation artificielle :

La transformation artificielle est d'un usage courant dans les laboratoires de biologie moléculaire. Elle a pour but de transférer diverses molécules d'ADN à des bactéries non naturellement transformables telles qu'*Escherichia coli*.

Pour rendre compétente la bactérie réceptrice, on utilise des techniques permettant de perforer les enveloppes bactériennes. Une de ces techniques consiste à placer les bactéries et l'ADN transformant dans un milieu riche en calcium et à soumettre le mélange à un choc thermique (chauffage à 42 °C suivi d'un refroidissement brutal dans la glace).

Une autre technique classique est celle de l'électroporation qui consiste à soumettre les bactéries à des impulsions électriques à haute tension (16kV/cm) ayant pour but de créer des pores dans les enveloppes bactériennes. (Singleton P., 2005).

III-1-4 La transfection :

Une bactérie peut être transformée avec de l'ADN ou ARN extrait d'un virus bactérien. Ce processus est connu sous le nom de transfection.

Si l'ADN provient d'un bactériophage lytique, la transfection conduit à une production virale. La transfection est utile pour étudier les mécanismes de transformation et de recombinaison, car la petite taille des génomes de phages permet d'isoler une population assez homogène de molécules d'ADN. Elle apporta dès 1964 l'évidence expérimentale de l'universalité du code génétique. Il est maintenant possible de faire adopter aux bactéries des gènes d'eucaryotes par transformation artificielle. (Mardigan M et al., 2007 ; Ferron A., 1984).

III-1-5 Importance de la transformation :

- L'importance pour les bactéries de la transformation naturelle est encore discutée et il existe trois grandes hypothèses :
 - La captation d'un ADN étranger pourrait constituer une source de nucléotides et la transformation n'aurait qu'une importance nutritionnelle.
 - La transformation serait un mécanisme permettant à la bactérie de réparer des lésions de son ADN en incorporant de l'ADN potentiellement homologues.
 - La captation d'ADN permettrait à la souche réceptrice d'augmenter la diversité de son potentiel génétique. [9].
- Ce mode de transfert a un grand intérêt historique : L'ADN est bien le support chimique de l'hérédité, et non les protéines.
- Il a permis l'établissement des premières cartes génétiques partielles chez les bactéries.
- C'est une technique de base du génie génétique, utilisée quotidiennement dans les laboratoires lors de clonage.
- Le concept de transférer de l'ADN par simple contact a été développé avec des ADN viraux dans les années 65, d'où le terme de transfection.
- En bactériologie médicale, son intérêt est lié à l'émergence d'espèces résistantes aux antibiotiques comme le pneumocoque ou récemment, le méningocoque.
- La découverte ultérieure de la transformation "artificielle" a permis alors de transférer divers ADN sous forme de chimère ou hybride comme un plasmide sur lequel sont clonés des gènes bactériens, animaux ou humains à des bactéries non transformables naturellement comme *E. coli*. [12].

III-2 La Conjugaison

III-2-1 La découverte de la conjugaison :

En 1946 Joshua Lederberg et Edward Tatum étudiaient deux souches d'*E. coli* présentant des exigences nutritionnelles différentes.

- ❖ Les souches **A** ne poussait sur un milieu minimum que si l'on y ajoutait de la méthionine et de la biotine. On décrit la souche A comme étant *met-* *bio-* *thr+* *leu+* *thi+*
- ❖ La souche **B** ne poussait sur un milieu minimum que si on y additionnait de la thréonine, de la leucine et de la thiamine. On décrit la souche B comme *met+* *bio+**thr-* *leu-* *thi-*.
- ❖ Les souches **A** et **B** sont mélangées et on sait que certains descendants sont de type sauvage, c'est-à-dire qu'ils ont retrouvé la capacité de croître sur un milieu minimum sans plus d'addition de nutriments .

Lederberg et Tatum étalèrent les bactéries sur des boîtes contenant du milieu minimum sans supplément nutritionnel des bactéries de la souche A ou de la souche B, ou encore un mélange des deux souches incubées ensemble pendant plusieurs heures dans un milieu liquide contenant tous les suppléments.

Aucune colonie n'apparut sur les boîtesensemencées avec uniquement des bactéries A ou B, ce qui montre que des réversions n'avaient pu restaurer la prototrophe, c'est-à-dire la capacité à pousser sur un milieu minimum sans supplément. Néanmoins, des colonies apparurent sur les boîtesensemencées avec un mélange de bactéries A et B, à la fréquence de 1/10 000 000 cellules étalées. Ce résultat suggérait qu'une sorte de recombinaison de gènes avait eu lieu entre les génomes des deux souches, produisant des prototrophes (Fig .07).

(Griffiths A J F et al.,2005).|13|.

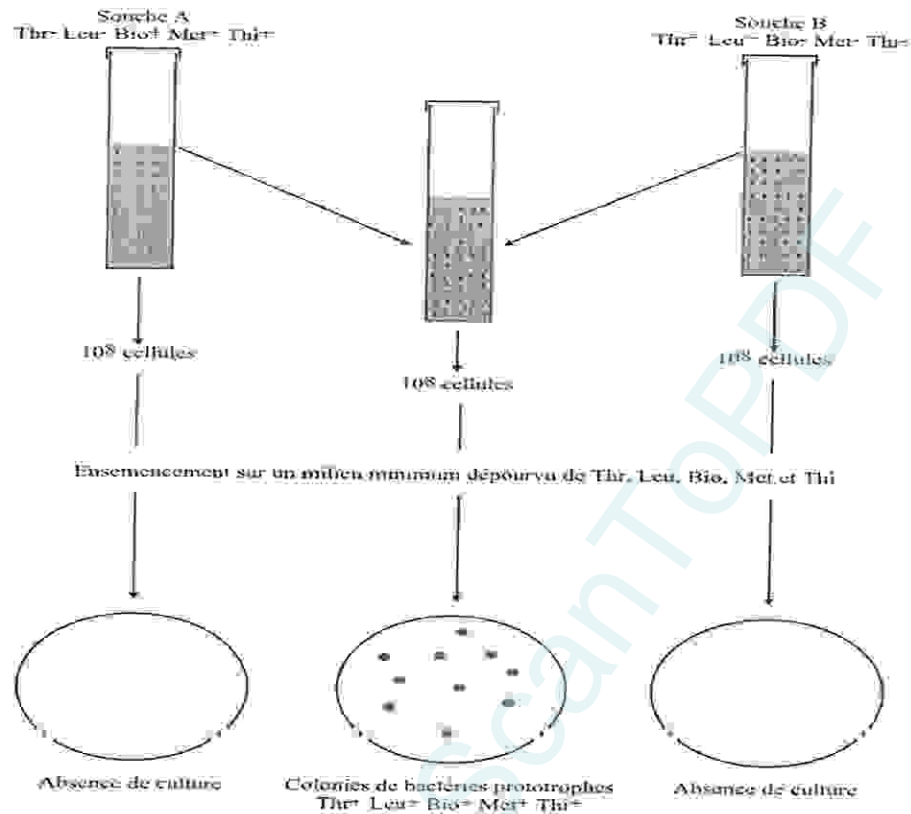


Fig.07: Découverte de la conjugaison (Lederberg et Tatum 1946). [13].

III-2-2 Définition :

Processus sexuel strict qui implique l'union temporaire de deux cellules bactériennes de sexes différents suivi d'un transfert unidirectionnel d'une partie du matériel génétique par un pont cytoplasmique entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice, puis la dissociation des deux cellules (exconjugants). Le transfert concerne soit l'ADN chromosomique soit l'ADN plasmidique. (Ferron A., 1984 ; Prescott L M et *al.*, 2003).

III-2-3 Mécanismes de la conjugaison

III-2-3-1 Chez les bactéries Gram négatifs :

A- Le Croisement $F^+ \times F^-$

La conjugaison est déclenché par le contact entre deux cellules, un brin de l'ADN plasmidique est coupé et est transféré dans la receveuse.

L'enzyme nécessaire pour initier le processus, TraI, est codée par l'opéro *tra* du plasmide F^+ . Cette protéine a aussi une activité hélicase et est donc impliquée dans le déroulement du brin transféré.

Au cours de ce transfert, la synthèse d'ADN par le mécanisme du cercle roulant remplace dans le donneur le brin transféré, pendant que le brin d'ADN complémentaire est synthétisé dans la cellule receveuse. Alors, à la fin du processus, la cellule donneuse et la cellule receveuse possèdent des plasmides complets (Fig.08). (Mardigan M et *al.*, 2007).

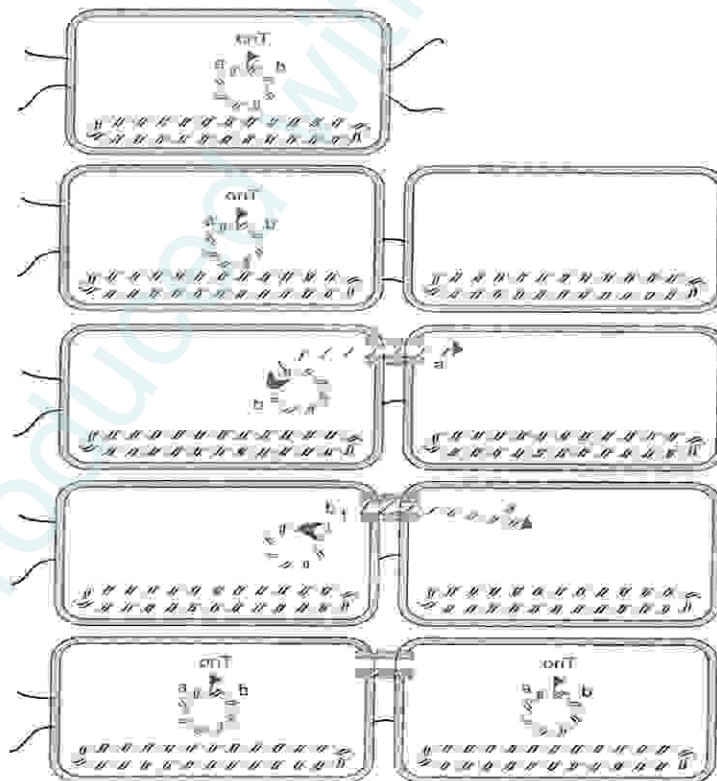


Fig. 08 : Le croisement $F^+ \times F^-$. [20].

III-2-3-2 Le Croisement Hfr X F⁻

Au cours d'un croisement F⁺ x F⁻, la fréquence des recombinaisons chromosomiques est approximativement de 10⁻⁷.

En 1953, Luca Cavalli-Sforza découvrit de nouvelles souches, dérivées de bactéries F⁺, et capables de transférer des marqueurs chromosomiques avec une fréquence 1000 fois plus importante. Ces souches furent désignées Hfr pour haute fréquence de recombinaison (High frequency of recombinaison).

Le transfert d'ADN débute lorsque le facteur F intégré subit une coupure à son site d'origine du transfert. Tout en se répliquant, le chromosome passe par le pilus ou le tube de conjugaison réunissant donneur et receveur. Parce que la coupure initiale se fait dans le plasmide F, seule une partie en est transfert au début de la conjugaison.

Dans un croisement Hfr x F⁻ les bactéries F⁻ ne deviennent généralement pas F⁺ ou Hfr. (Fig.09). (Prescott L.M et al.,2003).[13].

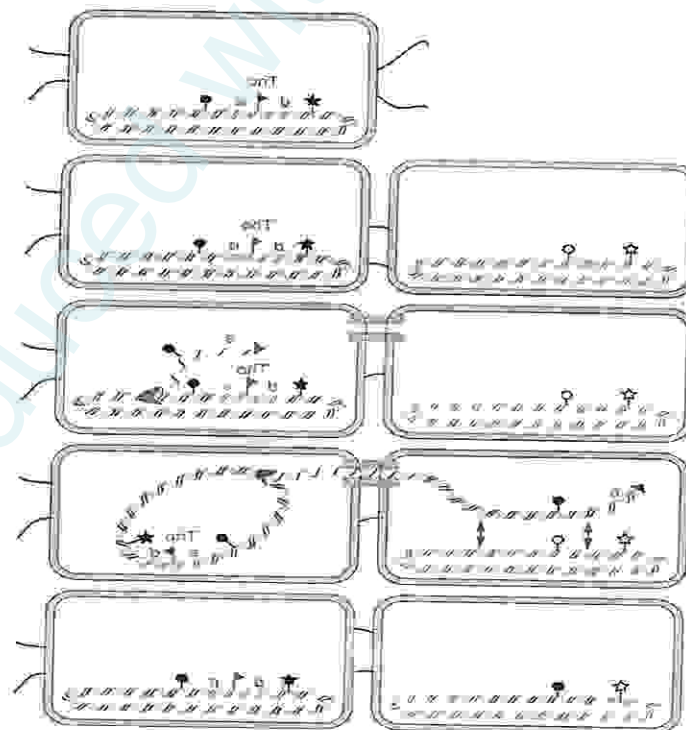


Fig.09 : Le croisement HFr X F⁻. [20].

III-2-3-3 Le Croisement $F' \times F^-$

Le plasmide F étant un épisode, il peut quitter le chromosome bactérien. Généralement l'excision du facteur F s'effectue correctement mais, dans quelques cas, l'excision est incorrecte et le facteur F emporte avec lui une petite fraction du chromosome. Le facteur F possède alors toute l'information génétique nécessaire à la conjugaison et, de plus, il porte un ou quelques marqueurs chromosomiques. Un facteur F ainsi modifié est appelé F' .

La conjugaison $F' \times F^-$ est essentiellement identique au croisement $F^+ \times F^-$. Ici également, le plasmide est transféré mais habituellement les gènes bactériens sur le plasmide F' sont transférés avec celui-ci et ne doivent pas être incorporés dans le chromosome de la cellule receveuse afin d'être exprimés, (Fig.10).

De cette manière, des gènes bactériens spécifiques peuvent se répandre rapidement dans une population bactérienne. Un tel transfert de gènes bactériens est souvent appelé **sexduction**. (Prescott L M et al.,2003).[13].

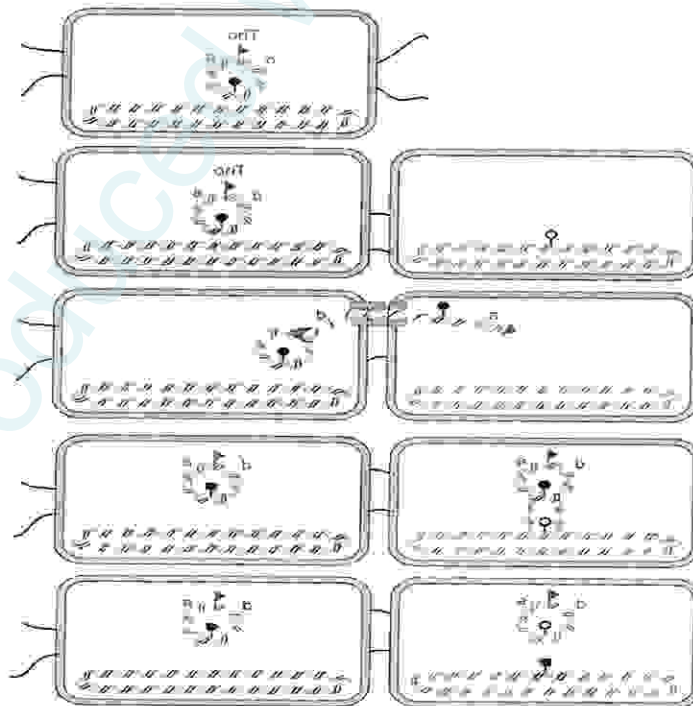


Fig.10 : le croisement $F' \times F^-$. [20].

III-2-3-2 Chez les bactéries Gram positif :

Bien que la plupart des recherches sur les plasmides et la conjugaison aient été effectuées sur *E. coli* et d'autres bactéries Gram négatives, il existe des plasmides auto-transmissibles chez des genres bactériens Gram positif, comme *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* 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.

Les 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. (Prescott L. M et al., 2003).

III-2-4 Conjugaison sans plasmide (transposition conjugatif) :

La transposition conjugative est une conjugaison due à un transposon conjugatif. Aucun plasmide conjugatif n'y intervient.

Découverte d'abord chez les bactéries Gram positives, elle est maintenant bien connue chez les bactéries Gram-négatives. Des données indiquent qu'il peut y avoir transfert génétique entre bactéries Gram positives et Gram négatives. [5]

III-3 La transduction :

En 1951, Joshua Lederberg et Norton Zinder découvrirent que certains phages sont capables de « mobiliser » des gènes bactériens et de les transporter d'une cellule à une autre. Ils appelèrent ce phénomène, transduction, (Griffiths A J F., 2002).

III-3-1 Définition :

Il s'agit d'un transfert partiel d'ADN bactérien par l'intermédiaire de bactériophages, (vecteurs passifs). Dans la bactérie réceptrice, ce transfert de gènes bactériens peut s'accompagner d'une recombinaison génétique.

Il est décrit aussi ou bien chez les espèces bactériennes à gram positif (staphylocoque, bacillus) qu'à gram négatif (enterobactéries, pseudomonas).. (Feron A., 1984).

III-3-2 Mécanisme de la transduction

III-3-2-1 La transduction généralisée :

Dans la transduction généralisée (non spécifique), les phages possèdent une endonucléase qui fragmente les chromosomes bactériens de telle sorte que n'importe quel gène d'une bactérie donatrice peut être intégré dans la capsid des phages et transféré à une bactérie réceptrice. Le segment d'ADN bactérien est nécessairement réduit pour être contenu dans la capsid et seuls les gènes très proches l'un de l'autre peuvent être transmis par un même phage (cotransduction).

La destinée de l'ADN bactérien transféré par un phage n'est pas la même selon que la transduction est dite **complète** ou **abortive**.

Dans la **transduction complète**, le fragment transféré s'intègre dans le chromosome de la bactérie réceptrice et le recombinant ainsi obtenu transmis à toute sa descendance le caractère transduit.

Dans la **transduction abortive**, beaucoup plus fréquente que la précédente, le fragment transféré n'est pas intégré dans le chromosome ni répliqué. Il n'est donc transmis de la cellule mère qu'à une des cellules filles. Les gènes qu'il contient continuent néanmoins à s'exprimer (transcription). (Fig.11).

Si par exemple le fragment transféré à une bactérie immobile comporte les gènes déterminant la synthèse de flagelle actif, cette bactérie deviendra mobile et donnera naissance en se divisant à une bactérie mobile et à une bactérie immobile. A chaque division, la mobilité se transmettra ainsi indéfiniment à une seule bactérie. (Ferron A., 1984).

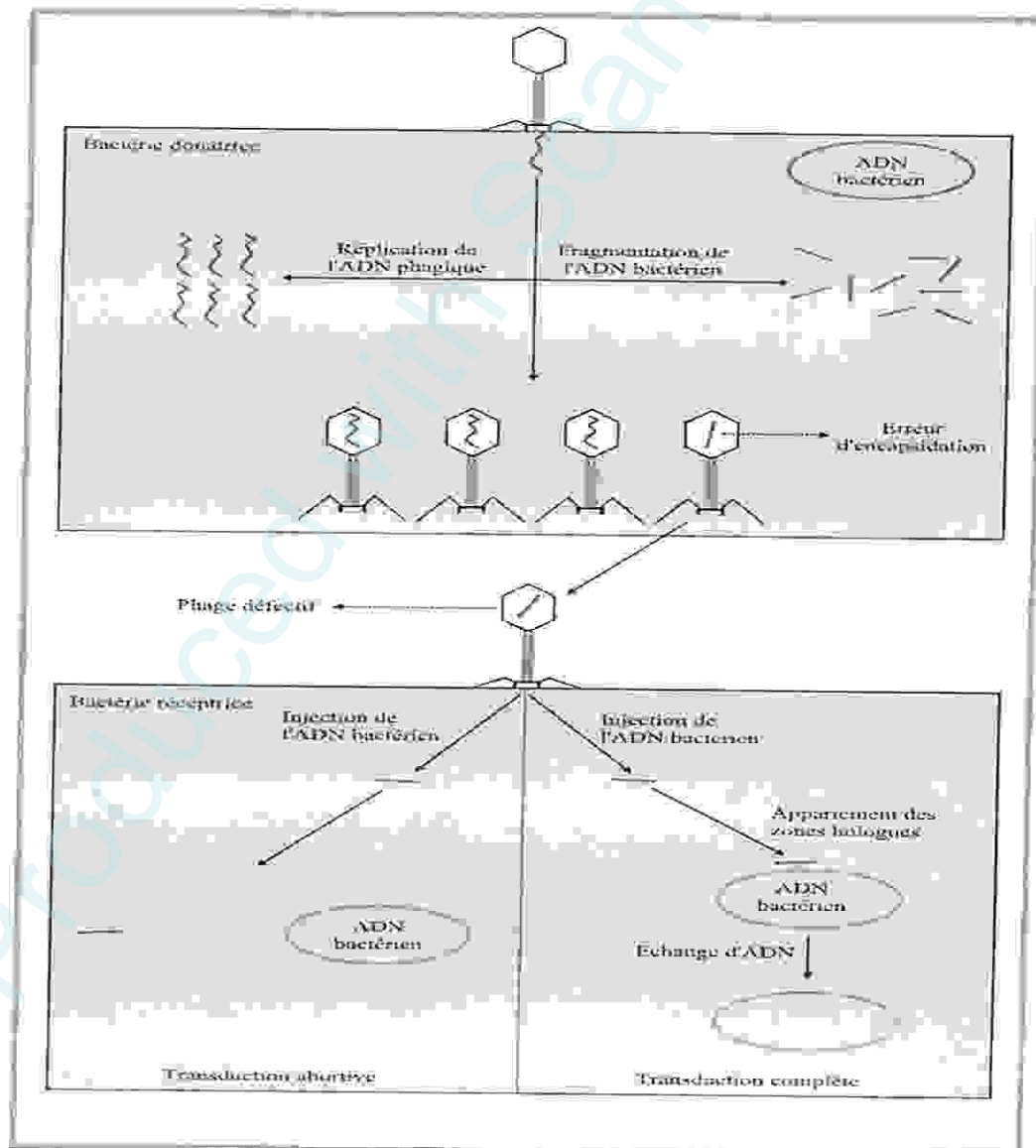


Fig.11 : La transduction généralisée par les bactériophages. [14].

III-3-2-2 La transduction spécialisée :

La transduction spécialisée (localisée, restreinte, spécifique) est un phénomène très particulier avec le phage lambda d'*E.coli* qui transfère la propriété de métaboliser le galactose.

Le prophage est situé sur le chromosome bactérien au voisinage immédiatement des gènes responsables du métabolisme du galactose de telle sorte qu'au cours de la réplication du bactériophage, ces gènes peuvent se substituer à une partie du génome phagique (Fig.12).

Une fois libre les bactériophages peuvent transférer aux bactéries réceptrices la propriété de métaboliser le galactose, mais ces phages ayant perdu une partie de leur propre génome ne pourraient plus être répliqués : ils sont dites phages **défectif**. (Boulahbal F., 2002 ; Ferron A., 1984) .

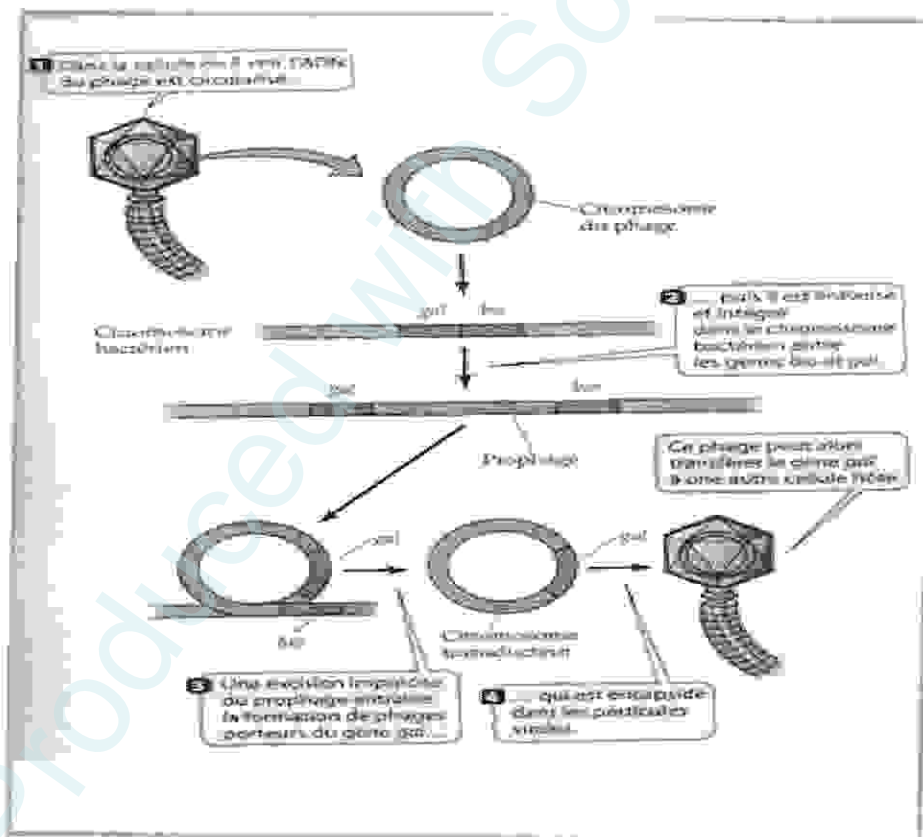


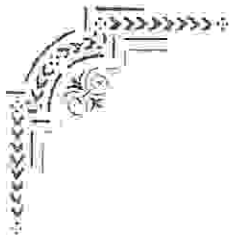
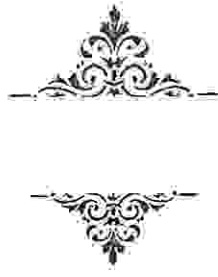
Fig.12 : La transduction spécialisée par un bactériophage tempéré. (Mardigan M et al., 2007)

III-3-4 La conversion lysogénique :

La conversion lysogénique est l'acquisition par une bactérie d'un caractère particulier somatique déterminé par le génome d'un prophage spécifique. Elle 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 phage. Par exemple, les souches de *Corynebacterium diphtheriae* qui provoquent la diphtérie sont lysogénies par un certain type de phage qui encodent et expriment une toxine puissante. Les souches qui ne portent pas le phage ne peuvent fabriquer la toxine et ne causent pas la diphtérie.

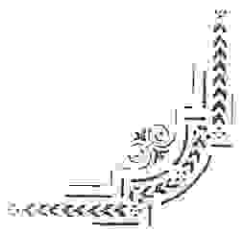
Chez *staphylococcus aureus*, l'intégration du phage L54a entraîne la perte d'une activité de lipase, due à l'inactivation du gène chromosomique correspondant.

Les caractères qui s'expriment dans tout les bactéries lié à l'état lysogène et disparaît avec la perte de cet état. (Ferron A., 1984. Singleton P., 2005).



Partie
Expérimentale

Produced with ScantOPDF





*Matériel et
Méthodes*

Produced with ScantOPDF



I-Matériel et Méthodes

Les deux bactéries qui ont fait l'objet de travail nous ont été gracieusement fournies par le laboratoire d'analyse bactériologique de l'hôpital Ibn Zohr de la ville de Guelma.

Avant d'examiner les travaux d'extraction et de transformation, il est nécessaire de réactiver les bactéries et de vérifier leurs morphologies, leurs caractères biochimiques ainsi que leurs comportements vis-à-vis les antibiotiques.

I-1-Etude bactériologique

I-1-1 Ensemencement sur milieu de culture :

- Faire bouillir le milieu Hektoen.
- Coller le milieu dans des boîtes de Pétri.
- Laisser solidifier, puis préparer les suspensions bactériennes.
- Ensemencer par des stries chaque souche dans une boîtes de Pétri.
- Incuber 24h à 37°C.

I-1-2 Coloration de Gram:

Protocole mis au point en 1884 par le bactériologiste danois Hans Christian Gram. Il permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer selon le type (gram+ ou gram-) et la morphologie (bacilles ou cocci). [20].

◆ Les étapes de coloration de Gram :

- A partir de la culture à étudier préparer un frottis.
- Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute.
- Ajouter le Lugol et laisser agir pendant 1 minute.
- Laver à l'eau puis à l'alcool.
- Recolorer avec la Fuchsine, laisser agir pendant 30 secondes.

◆ **Lecture :**

Observer au microscope avec l'objectif 100x:

- Les bactéries G- sont roses.
- Les bactéries G+ ont de coloration violette. (Bourdon J.L et Marchal. N. 1981)

I-2 Examen lié aux caractères biochimiques :

I-2-1 La Galerie API 20E :

La galerie API 20E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram(-), utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

◆ **Principe :**

La galerie API 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

◆ **Mode opératoire :**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Remplir tubes et cupules des tests : [CIT], [VP], [GEL], avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

- **Lecture :**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positif : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.
- Test IND : ajouter une goutte de réactif de kowacks. Un anneau rouge obtenu en 2minutes indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E.

1-3 L'antibiogramme :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus. [15].

• Principe :

Le principe de l'antibiogramme est de mettre la bactérie en présence du ou des antibiotique(s) et d'observer les conséquences sur la vie de la culture bactérienne.

Il peut se faire en milieu solide sur gélose (méthode des disques) ou en milieu liquide (méthode des dilutions).

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante. [16].

◆ Mode Opérateur :

Il existe deux techniques d'ensemencement : inondation par la suspension préparé ou étalement à l'aide d'un écouvillon trempé de la suspension.

Nous avons utilisé la première technique qui passe par les étapes suivantes :

• L'inondation :

- Inonder la boîte avec la suspension prélevée à la pipette.
- Bien répartir la suspension en inclinant la boîte dans toutes les directions.
- Aspirer à la pipette l'excès de la suspension.
- Sécher les boîtes pendant une dizaine de minutes.

- **Application des disques :**

- Déposer à la surface les disques d'ATB choisis en les appuyant légèrement à l'aide de la pince stérilisée.

- **Incubation :**

- Les boîtes sont placées dans l'étuve à la température adéquate (37°C) pendant 24h.

- **Lecture et interprétation :**

La mesure des diamètres autour des disques. (Joffin J N et al., 2001)

- ❖ Les antibiotiques utilisés sont présentés dans le tableau III:

Tab.III: les antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Sigle	Classe	Charge de disque
Acide pipemidique	Pi	Quinolone 1 ^{er} gén.	20µg
Tétracycline	T	Tétracyclines	30µg
Erythromycine	E	macrolides	15µg
Amoxicilline	Amx	Aminopéniciline	25µg
Sulfamide	SSS	sulfamides	200µg
pristinamycine	PT	Macrolides-straptogramines	15µg

I-4 L'extraction d'ADN plasmidique :

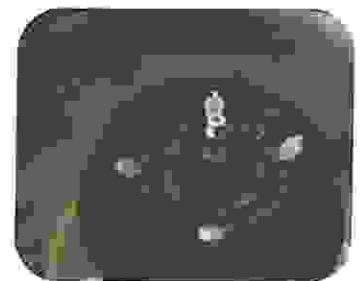
L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que la transformation, le séquençage, la PCR ou le clonage. [22]. L'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée selon la méthode décrite par Birnboim H. et Doly S en 1979.

1- Culture de la bactérie résistante :

- Ensemencer *E.coli*, révélée résistante aux antibiotiques par testes d'antibiogramme dans des boîtes de Pétri contenant Hektoën.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

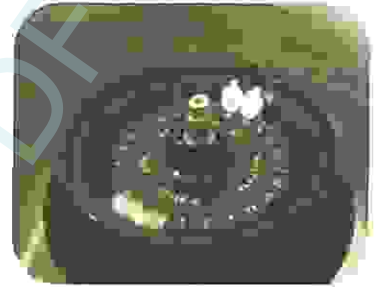
2- L'extraction de l'ADN plasmidique.

- Ajouter 1ml de tampon de lyse (TES) sur la culture précédente et à l'aide d'un râteau récupérer la suspension dans des tubes Eppendorff.
- Réaliser une centrifugation à 12000 tour/min pendant une minute.
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans du tampon de lyse bactérienne (TES) puis vortexer.

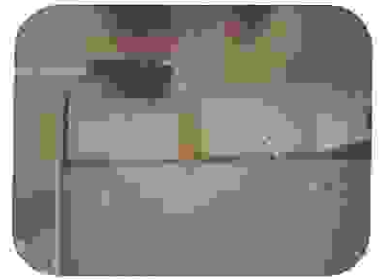


➤ Ajouter du SDS, et du NaOH.

➤ Réaliser une deuxième centrifugation à 12000 tour/min pendant 10min.



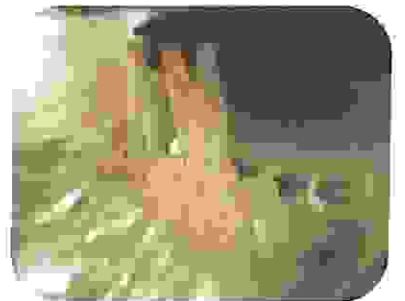
➤ Récupérer le culot et le suspendre dans de l'acétate de sodium et de l'isopropanole.



➤ Vortexer et laisser quelques minutes au froid (4°C).



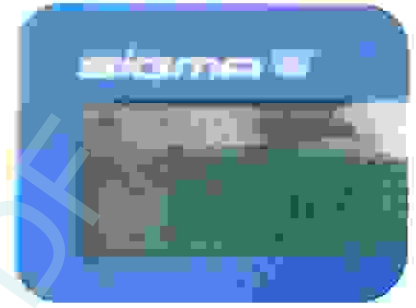
➤ Centrifuger, récupérer le culot et laisser sécher.



➤ Ajouter de l'éthanol froid.



- Centrifuger et laisser les tubes ouverts pour que l'éthanol s'évapore.



- Conserver l'ADN dans le TE à 4° C.



I-5 L'électrophorèse :

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur taille et de leur poids moléculaire respectivement.

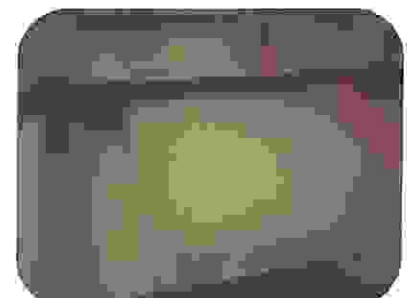
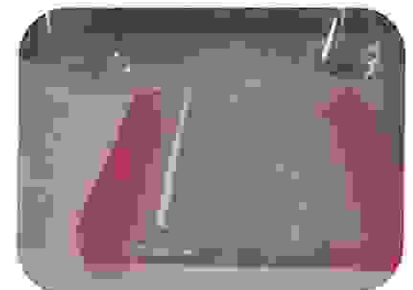
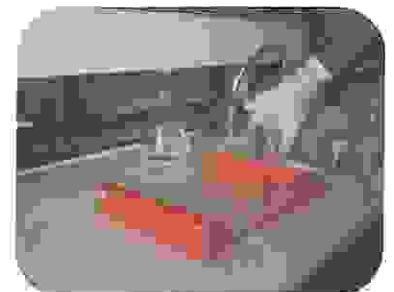
- **Principe :**

La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures. [18].

Nous avons suivi ces étapes pour la réalisation de l'électrophorèse :

1-Préparation du gel

- Mélanger l'agarose à raison de 1% dans le tampon TBE (Tris, Acide Borique, EDTA).
- Chauffer jusqu'à ébullition pour dissoudre l'agarose.
- Ajouter 0,5 de bromure d'éthidium à l'agarose.
- Couler le gel lentement dans un moule jusqu'à 3 à 5mm d'épaisseur.
- Placer un peigne, pour créer des puits pour les dépôts.
- Une fois le gel est solidifié retirer délicatement le peigne, puis placer le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie par le tampon TBE.



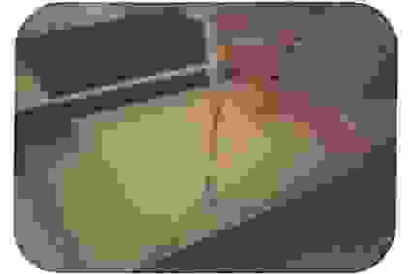
2-Préparation des échantillons à analyser

- Dans un tube Eppendorff, mélanger 10µl de l'échantillon d'ADN à analyser avec 10µl d'eau distillé et 10µl de colorant de charge (bleu de bromophénol).



3-dépôt

- L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette dans les puits.
- Brancher les câbles de la cuve au générateur de manière à ce que les dépôts soient du côté cathode (-).



4-Migration

- La migration de l'ADN est faite de la cathode vers l'anode sous un champ électrique de 69V.

5-L'observation :

- L'observation des bandes est obtenue sous une lampe à UV à 254 nm.

I-6 Transformation bactérienne :

La transformation a été effectuée selon la méthode décrite par Birnboim H. et Doly S. en 1979.

• Préparation des bactéries compétentes

- Une préculture de la souche réceptrice sur le bouillon d'enrichissement nutritif est incubée à 37°C pendant une nuit sous agitation.
- Relancer la culture au 1/20 à 37°C sous agitation pendant 2 heures pour obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance.
- Centrifuger à 6000 t/min pendant 5min.
- Reprendre le culot par 1ml de CaCl₂ (0,1M) froid.
- Réaliser une deuxième centrifugation à 6000t/min pendant 5min.
- Ajouter 1ml de CaCl₂ au culot et laisser le mélange 20 min à 4° C.
- Réaliser une troisième centrifugation à 6000 t/min pendant 5min.
- Reprendre le culot dans 50 µl de CaCl₂ froid.

• Transformation bactériennes :

- Mettre dans un Eppendorf 10 µl d'ADN et 20 µl des cellules compétentes.
- Mettre l'Eppendorf à 37°C pendant 1min puis 1heure dans la glace.
- Ajouter 1ml du bouillon nutritif et incubé sous agitation pendant une heure à 37°C.

Après la transformation, on est passé à la vérification de la possible acquisition de caractère de résistance par la bactérie réceptrices et ceci par antibiogramme. .



Résultats et Discussions

Produced with ScanTOPDF



I-Etude bactériologique

I-1 Culture sur Hecktoen :

L'isolement d'*E. coli* sur ce milieu nous a permis d'obtenir des colonies qui apparaissent en jaune saumon, bombées et lisses. (Fig.13).

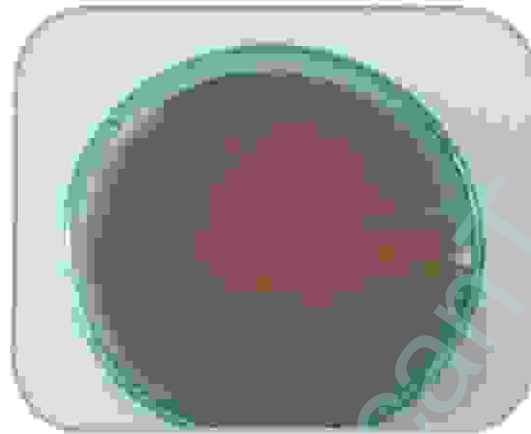


Fig. 13 : Aspect des colonies des *E. Coli* sur Hecktoen.

Ces aspects macroscopiques répandent à ceux d'*E. coli*.

I-2 Coloration de Gram :

L'observation microscopique après coloration de Gram nous a permis de révéler la morphologie d'*E. Coli* qui est : Bacille à Gram négatif. (Fig.14).

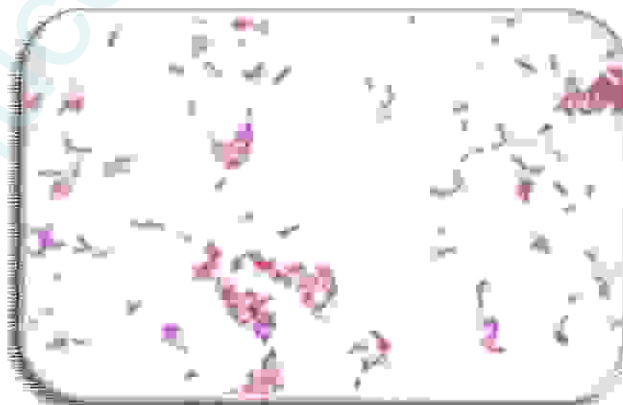


Fig. 14 : Aspect des souches *E. coli* après coloration de Gram.

II- Examen liés aux caractères biochimiques :

II-1 API20 :

Le test API20 nous a permis de confirmer qu'il s'agit de l'espèce *E. coli* (Fig.15, Tab IV et Tab V).



Fig. 15 : Résultat d'identification biochimique d'*Escherichia coli* par la galerie API20.

Tab.IV : Résultat des 10 premiers tests de la galerie AP I 20.

Caractères	ONPG	ADH	LDH	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Souche										
<i>E. coli</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Tab.V : Résultat des 10 derniers tests de la galerie AP I 20

Caractères	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Souche										
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

III-Antibiogramme :

Les résultats du test d'antibiogramme obtenus est résumé dans le tableau VI (Fig. 16).

Tab. VI: Résultats des testes d'antibiogramme.

Souche	<i>E. Coli 1</i>	<i>E. Coli 2</i>
Antibiotiques		
Erythromycine	R	S (1,4mm)
Acide pipemidique	R	S (2,7mm)
Sulfamide	R	S (1,2mm)
Amoxicilline	R	R
Tétracycline	R	S (2,5mm)
Pristinamycine	R	S (1mm)

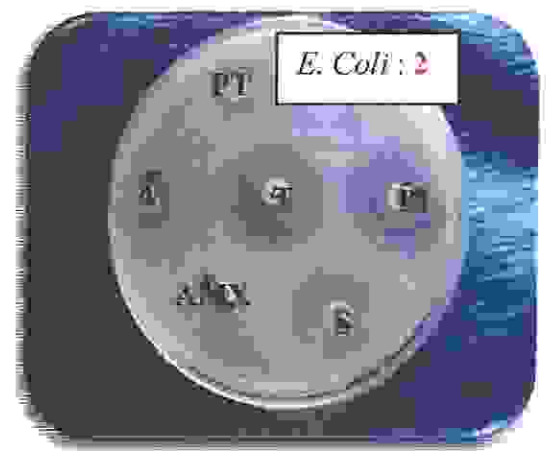
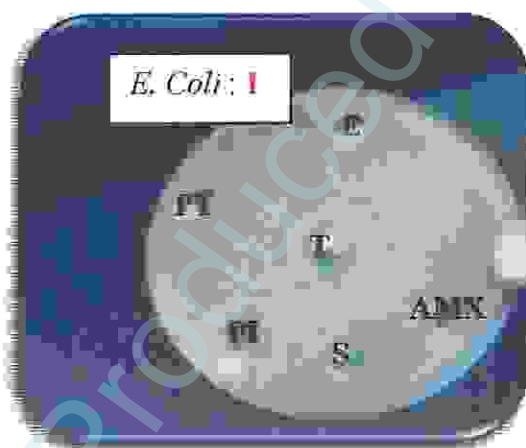


Fig. 16 : Résultats de l'antibiogramme d'*E. coli* (1) et d'*E. coli* (2).

A partir de ces résultats nous constatons une différence dans le comportement des espèces d'*E. coli* vis-à-vis les antibiotiques où *E. coli* (2) est fortement résistante aux cinq antibiotiques qui sont : Acide pipemidique, Tétracycline, Erytromycine, Sulfamide et Pristinamycine, qui laisse penser que cette espèce renferme un ou plusieurs molécules d'ADN plasmidique qui contient le ou les gènes de résistance aux antibiotiques.

On partant sur cette hypothèse, nous avons procédé à l'isolement du plasmide à partir de l'espèce résistante *E. coli* (2), pour transformer ensuite *E. coli* (1) sensible aux antibiotiques précédents.

Il y à signaler que les deux souches testées sont résistantes à l'amoxiciline.

VI- L'extraction de l'ADN plasmidique :

L'extraction a permet d'obtenir un précipité caractéristique de l'ADN plasmidique : culot visqueux et coloré en orange (Fig.17). Cette coloration provient probablement du milieu Hektoen.

L'extraction nécessite une analyse par électrophorèse pour déterminer la taille ainsi que le degré de pureté.



Fig.17 : Un précipité d'ADN plasmidique.

V- L'électrophorèse :

Afin d'estimer le degré de pureté ainsi que la taille de ces ADN plasmidiques, l'observation à UV nous a permis de visualiser des bandes d'ADN bien nettes colorées en rouge-orangée en raison de la fluorescence du BrEt sous la lumière UV (Fig.18).

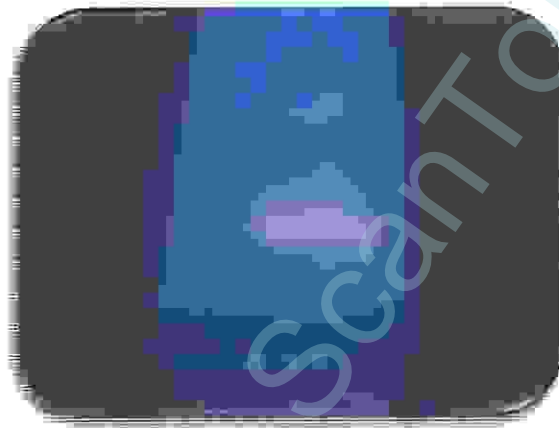


Fig. 18 : l'observation des bandes d'ADN sous UV.

Le non disponibilité d'un témoin de taille, nous a empêchées de l'utiliser et donc d'estimer la taille des bandes obtenues.

IV-Transformation :

Le résultat de la transformation de l'espèce sensible par l'ADN plasmidique extrait à partir de l'espèce résistante est vérifié par le test d'antibiogramme.

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau VII ainsi que dans la Fig.19

Tab.VII : Les résultats des tests d'antibiogrammes après transformation.

Antibiotiques	<i>E.coli</i> non transformée	<i>E.coli</i> transformée
Acide pipémidique	S (2,7mm)	S (2,7mm)
Erythromycine	S (1,4mm)	S (1,4mm)
Tétracycline	S (2,5mm)	S (2,2mm)
Pristinamycine	S (1mm)	S (0,8mm)
Sulfamide	S (1,2mm)	R

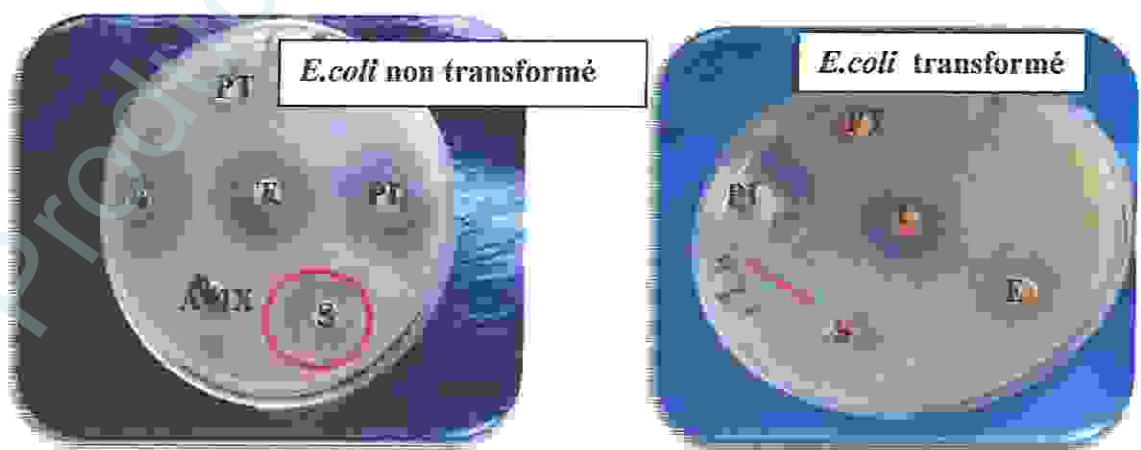
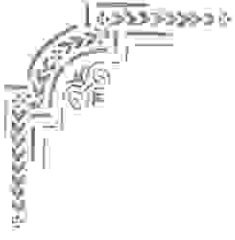


Fig.19: Les résultats de test de l'antibiogramme avant et après de la transformation.

L'analyse de ces résultats montre que *E.coli* testée est sensible aux antibiotiques, et ceci avant la transformation. Cependant, après transformation nous avons constaté que cette bactérie reste toujours sensible aux antibiotiques : Acide pipémidique, Erythromycine, Pristinamycine, ainsi qu'avec la tétracycline mais avec un diamètre d'inhibition inférieur. Selon Joffin J N, Leyral G., (2001) la zone d'inhibition de 2,2mm est considérée comme zone de sensibilité.

Seul le comportement avec le sulfamide a montré un changement radical de sensible vers résistant. Cette dernière observation peut être expliquée par la réussite de la transformation, c'est-à-dire l'acquisition de l'ADN plasmidique portant le gène de résistance au sulfamide par *E.coli* initialement sensible au sulfamide.



Conclusion

Produced with Scantopdf



La bactérie *E. coli* peut héberger dans son cytoplasme des plasmides portant la caractéristique de résistances aux antibiotiques dont certains sont transférables à d'autres *E. coli* dépourvue de plasmides.

Avec les résultats de la transformation obtenus dans ce travail, nous constatons que le pouvoir de transformation des plasmides entre les bactéries est un phénomène naturelle. Cependant, il est la cause de l'apparition du caractère de résistance, ce qui conduit souvent au développement des infections surtout dans le milieu hospitalier.

A l'issue de ce travail, nous considérons que nous avons atteint les objectifs fixés au préalable à savoir l'extraction d'ADN plasmidique, la transformation bactérienne et la démonstration du pouvoir transformant de l'ADN plasmidique. Nous souhaitons que ces modestes résultats ne soient que le commencement pour d'autre étude de biologie moléculaire dans notre laboratoire.



Résumé

Produced with ScantOPDF



خلال هذا العمل ، استخدمنا أربع خطوات لدراسة قدرة تحول الصفات المحمولة بواسطة البلاسميدات من بكتيريا إلى أخرى :

- 1- استخراج الحمض النووي البلاسميدي من البكتيريا *E.coli* المقاومة لسلفاميد.
- 2 - تنقية هذا الـ ADN البلاسميدي عن طريق الرحلان الكهربائي على هلامة الاجاروز و ملاحظتها على لوحة الاشعة فوق البنفسجية.
- 3 - عملية التحول البكتيري لبكتيريا *E.coli* حساسة لسلفاميد عن طريق الحمض النووي البلاسميدي.
- 4 -- التأكيد من تحول البكتيريا الحساسة الى بكتيريا مقاومة لسلفاميد.

كلمات مفتاحية : البلاسميد- *E.coli* - المقاومة - الحساسية - التحول البكتيري.

Résumé

Au cours de ce travail, nous avons utilisée 4 étapes pour l'étude du pouvoir de la transformation des caractères transportés par les plasmides d'une bactérie à une autre :

1- L'extraction de l'ADN plasmidiques à partir d'une bactérie *Escherichia coli* résistante au sulfamide.

2- Séparation de cet ADN plasmidique par migration sur gel d'agarose, et son observation sur plaque à UV.

3- La transformation d'une bactérie *E.coli* sensible au sulfamide par cet ADN plasmidique.

4- Confirmation de la transformation de la bactérie sensible en une bactérie résistantes au sulfamide.

Les mots clés : *E. coli*, plasmide, résistante, sensible, transformation.

Produced with Scantopdf

Abstract:

During this work, we used four steps to study the power of transformation characters carried by the plasmids from one bacterium to another:

- 1- Extraction of plasmid DNA from bacteria *E.coli* resistant to sulfamide.
- 2- Separation of the DNA plasmid by migration on agarose gel, and its observation on UV plate.
- 3 - The transformation of bacteria *E.coli* sensitive to sulfamide by the DNA plasmid.
- 4- Confirmation of the transformation of bacteria sensitive to bacteria resistant to sulfamide.

Key words: plasmid, *E.coli*, resistant, sensitive, transformation.

Produced with ScanTopDF

- **Aouissi A. (2009).** Microbiologie et physico-chimie de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie) 145p.
- **Birnboim H. and Doly S.,(1979).** A rapide alkaline extraction procedure for secreening recombinant plasmid DAN Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- **Boulahbal F., (2002).** Microbiologie s₁ clinique. Office des publications universitaire.173p.
- **Bourdon J.L et Marchal. N., (1981).** Technique bactériologique. *DOIN*.335p.
- **Carrp C., (2008).** Microbiologie hygiène ; base microbiologique de la diététique. édition janvier paris.*Tec et Doc*. p429.
- **Cunin R., (1993).** Génétique bactérienne .Auout .*Vigot*.206p.
- **Elrod S. et Stansfield W., (2003).** Génétique 4^{ème} édition. Ediscience .490p.
- **Fauchère J-L et Avril J-L., (2002).** Bactériologie générale et médicale. ellipses.edition marketing S.A Paris. 237 P.
- **Ferron A., (1984).** Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12^{ème} édition.*EDITION C.et R*.376p.
- **Frobisher M. et Fuerst R., (1976).** Microbiologie clinique. *HRW*.507P.
- **Grifiths A J F. Miller J H. Suzuki D T. et Lewontin R C et Gelbart W M., (2002).** Introduction à l'analyse génétique.3^{ème} édition.*Deboek*. 860 p.
- **Guiraud J-P., (1998).** Microbiologie alimentaire. *Dunod*.625p.

- Joffin J N. Leyral G., (2001).** Microbiologie technique I Dictionnaire des techniques.3^{ème} édition .*CRDP AQUITAINE*.312p.
- **Le Minor L et veron M., (1982).** Bactériologie médicale.1^{ère} édition.773p.
 - **Mardigan M et Martinko J., (2007).** Brock biologie des microorganismes.11^{ème} édition.Pearson.1047p.
 - **Nauciel CH .et Vildé J-L., (2005).** Bactériologie médicale: connaissance et pratique.2^{ème} éditions. *MASSON*.257P.
 - **Nicklin J. Graeme- cook K. Paget et Killington R., (2000).** L'essentiel en microbiologie. *Paris. Berti* .365p.
 - **Perry J J. Staley J T. et Lory S ., (2004).** Microbiologie cours et question de révision.*Dunod, paris* . 891p
 - **Pilet C. Bourdon J.L. Toma B. Marchal N. Balbastre C.et Person J-M., (1987).** Bactériologie médicale et vétérinaire : Systématique bactérienne. *Doim* . 372p.
 - **Prescott L M. Harley J P. et Klein D A., (2003).** Microbiologie.2^{ème} édition française. *Deboeck*.1137p.
 - **Primrose S .et Twymen R., (2004).** Principe de génie génétique.1^{ère} édition. *Deboeck* .400p.
 - **Singleton P., (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.6^{ème} édition. *Dunod*.542p.

[17]- http://fr.wikipedia.org/wiki/Extraction_d'ADN. (10 juin 2010).

[18]- http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se_en_gel_d'agarose. (11 juin 2010).

[19]- http://www.google.fr/search?q=transformation+bact%C3%A9riennes+ppt.&hl=fr&rlz=1R2SKPB_frDZ376&start=10&sa=N. (12 juin 2010).

[20]- www.iefg.biotoul.fr/.../cours.../cours_de_genetique.ppt. (15 juin 2010).

Produced with ScanTOPDF