

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem



Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Génétique Fondamentale et Appliquée

Par
**Benarbia Chaima
&
Chaker Amel**

Thème :

"Sélection de quelques mutations phénotypiques de *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli* par mutagenèse UV."

Soutenue le 23/06/2024 devant le jury composé de :

Présidente	ABBASSENE. Fatiha	MCA	Université de Mostaganem
Encadreur	CHIBANI Abdelwaheb	Pr	Université de Mostaganem
Examinateur	BENALI S.Ahmed	MCB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023/2024

Dédicace

Dédie cette mémoire à...

A ma chère mère....

Affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la Source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier Pour moi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A mon cher père...

Es conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi Aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde. Que dieu Te donne longue vie et te protège.

A tous les membres de ma famille, petits et grands. Je vous dédie ce travail avec tous mes Vœux de bonheur, de santé et de réussite

A mes très chères amies et mes sœurs : Salsabila, Amina, Sakina, manel , Qui sont proches de mon cœur. Et mon Petit frère Bilal. Et ma petite sœur Racha.

Benarbia chaima

Dédicace

Au nom d'Allah le Plus Grand, je suis reconnaissant de Sa guidance sur le chemin droit.

Je dédie ce humble travail à ma chère mère et mon très cher père pour leur amour inestimable, leurs sacrifices et les valeurs qu'ils m'ont inculquées.

À mes précieux frères Ahmed et Abdelmadjid, à mes chères sœurs Hakima et Karima

*A mes très chers amis Amina, Halima et Wiaam à toute ma famille maternelle et paternelle,
à tous ceux qui me sont chers,*

A mon binôme Chaima .

Chaker Amel

Remerciements

*Nous remercions **ALLAH** tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous
Avoir bénie jusqu'à la réalisation de ce travail*

*Nous tenons à remercier sincèrement monsieur **CHIBANI ABED ELWAHAB** Entant que
directeur de mémoire qui accepter de nous encadrer et qui a Toujours montré à l'écoute et
très disponible tout au long de la réalisation de mémoire.*

*Nous remercions Mme. **ABBASSENE F.** pour avoir accepté de présider le jury.*

*Nous remercions Mr. **BENALI S.A** pour avoir acceptée d'examiner ce travail.*

Nous voudrons remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie.

Liste d'abréviation

A : Adénosine

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BN : Bouillon Nutritive

C : cytosine

G : Guanosine

GLU : Glutamine

Lac : Lactose

LB : Luria-Bertani

MM : Milieu Minimum

T : Thymine

U : Uracile

UV : Ultra Violet

UFC : Unités formant des colonies

XXe : La période de 1900 à 1999

XIXe : La période de 1801 à 1900

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'*Escherichia coli*

Tableau 2 : Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

Tableau 3 : les différents types d'agents mutagènes

Tableau 4 : concentration de l'antibiotique Gentamicine après dilution .

Tableau 5 : concentration de l'antibiotique ciprofloxacine après dilution

Tableau 6 : Le nombre de colonies en UFC / ml chez *Escherichia coli* après l'exposition à l'UV

Tableau 7 : Le nombre de colonies en UFC / ml chez *Proteus mirabilis* après l'exposition à l'UV

Tableau 8: résultat de test de l'antibiogramme (Sensible S) (Résistance R)

Liste des figures

Figure 1 : les formes des bactéries.....	5
Figure 2 : Morphologie et structure de la bactérie <i>Escherichia</i>	7
Figure 3 : Aspect de <i>Escherichia coli</i> sur milieu Mac Conkey.....	9
Figure 4 : Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux antibiotiques.....	12
Figure 5 : La structure en double hélice de l'ADN.....	19
Figure 6 : la structure chimique d'acide nucléiques.....	20
Figure 7 : Schéma de mutation faux sens.....	22
Figure 8 : Schéma de mutation non-sens.....	22
Figure 9 : Schéma de mutation même_sens.....	23
Figure 10 : Schéma L'ensemencement d'isolat <i>Escherichia coli</i>	28
Figure 11 : schéma de repiquage des colonies.....	29
Figure 12 : Schéma présente le protocole d'Exposition de suspensions au rayon ultraviolet.....	30
Figure 13 : Protocole de dilution décimale et étalement.....	31.
Figure 14 : Les tubes de dilution d' <i>Escherichia coli</i> après l'irradiation UV.....	32
Figure 15 : Antibiogramme d' <i>E. coli</i>	33
Figure 16 : Aspect macroscopique des colonies <i>Proteus mirabilis</i> sur gélose MM...	36
Figure 17 : Aspect macroscopique des colonies <i>Escherichia coli</i> sur gélose LB.....	36
Figure 18 : Croissance bactérienne d' <i>Escherichia coli</i> après l'irradiation par UV a différents dilution	37
Figure 19 : Croissance bactérienne <i>Proteus mirabilis</i> après l'irradiation par UV a Différents délutions.....	37.
Figure 20 : <i>Escherichia coli</i> dans milieu LB contenant antibiotiques (témoin).....	39

Figure 21 : Croissance bactérienne <i>d'Escherichia coli</i> après l'irradiation par UV a bactérie	39
Figure 22: Croissance bactérienne <i>d'Escherichia coli</i> après l'irradiation par UV sur gélose LB contenant ciprofloxacine.....	40.
Figure 23: <i>Escherichia coli</i> après confirmation	40.
Figure 24 : Croissance bactérienne <i>d'Escherichia coli</i> après l'irradiation par UV sur gélose LB contenant Gentamicine.....	41
Figure 25 : Master plate de <i>Proteuse mirabilis</i>	41
Figure 26 : <i>Proteus mirabilis</i> i dans milieu LB contenant antibiotiques (témoin)	
Figure 27 : Sélection des mutants dans différents milieux.....	42

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction

CHAPITRE I : LES BACTÉRIES.....	3
I.1 Histoire et définition des bactéries.....	3
I.2 Croissance et culture des bactéries.....	3.
I.3 Structure cellulaire.....	3.
I.4 Morphologie des bactéries.....	4.
I.5 la bactérie : <i>Escherichia coli</i>	5
I.5.1 Historique et l'habita.....	5
I.5.2 Taxonomie.....	6
I.5.3 Classifications.....	6
I.5.4 Caractères bactériologiques	7
I.5.5.1 Caractères morphologiques	7
I.5.5.2. Caractères biochimique	7.
I.5.5.3 Caractères antigéniques.....	8
I.5.5.4 Caractères cultureux.....	8
I.6 La bactérie : <i>Proteus mirabilis</i>	9
I.6.1 Généralité.....	9
I.6.2 Classification.....	9.

I.6.3	Habitat.....	10.
I.6.4	Caractère morphologique.....	10.
I.6.5	Caractères cultureux	11
1.7	Résistance bactérienne.....	11.
1.7.1	Types de résistance aux antibiotiques.....	11.
1.7.1.1	Résistance naturelle (intrinsèques)	11.
1.7.1.2	Résistance acquise (extrinsèque).....	11
1.7.3	Mécanismes de résistance bactérienne.....	12.
1.7.3.1	Inactivation des antibiotiques	12
1.7.3.2	Diminution de perméabilité.....	12
1.7.3.3	Acquisition d'un déterminant de résistance exogène	13
1.7.3.4	Résistance inductible.....	13.
1.7.4	Multirésistance.....	13
1.8	l'antibiotique	13
1.8.1	Définition.....	14.
1.8.2	Effets des antibiotiques.....	14.
1.8.2.1	Antibiotique bactériostatique.....	14..
1.8.2.2	Antibiotique bactéricide.....	14.
1.8.2.2.1	Antibiotique à spectre large.....	14
1.8.2.2.2	Antibiotique à spectre étroit.....	14.
1.8.2.2.3	Antibiotique à spectre moyen ou limité.....	14
1.8.3	Mode d'action des antibiotiques.....	14
1.8.3.1	Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne	14
1.8.3.2	Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique.....	15
1.8.3.3	Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique	15

1.8.3.4 Antibiotiques qui inhibent la synthèse des acides nucléique	15..
1.8.5. Classification.....	15
1.9Antibiogramme.....	16
CHAPITRE II : ADN ET MUTAGENÈSE.....	17
II.1 ADN.....	17
II.1.2 Le rôle d'ADN.....	17
II.1.3 Les acides nucléiques.....	17
II.1.4. Structure de l'ADN.....	19.
II.1.4 .1. La structure double hélice de l'ADN.....	19
II.1.4.3 La composition chimique et la structure des acides.....	20..
II.1.5 Localisation de l'ADN dans la cellule.....	21.
II.2 Mutations de l'ADN.....	21.
II.2.1 Définition de mutation.....	21.
II.2.2 La mutagenèse dirigée.....	21..
II.2.3 Les types des mutations.....	21.
II.2 .3.1 Mutation faux sens.....	21
II.2.3.2 Mutation non sens.....	22.
II.2.3.3 mutation silencieuse.....	22
II.2.3.4 Mutation de décalage de cadre.....	23.
II.2 .4 Les conséquences de mutation	23.
II.2 .4.1 les agents mutagènes.....	23
II.2.4.2 Les types d'agents mutagènes.....	24.
III . Matériel et Méthodes.....	25

III.1 problématique.....	25.
III.2 Origine des isolats.....	25
III.3. Lieu de travail.....	25
III. 4 Les milieux de cultures	25
III. 4.1. Les milieux liquide.....	25
III. 4.1.1. Le bouillon LB	26.
III.4.2 Les milieux solides	26
III. 4.1 Le milieu LB 27.....	26
III.4.2 Milieu minimum	26.
III. 5 Technique d'étude	26
III.5.1 L'ensemencement	26.
III. 5.2 Le repiquage.....	28.
III.5.3 Exposition UV.....	29.
III.5.4 Dilution décimale.....	30
5.5 Antibiogramme.....	31
Antibiogramme par disque.....	;...31.
III.5.6 Dilution de antibiotiques	32.
III. 5.7 Sélection des mutants	34.
IV RÉSULTATS	35
IV.1 Aspect macroscopique IV2.....	35.
L'effet de l'UV sur la survie de isolat.....	35..
IV 2.1 Résultats de la mutagénèse	35.
IV.3 L'antibiogramme.....	37
IV.3 L'antibiogramme par disque	37

IV 3.3 Méthodes de dilution	38
IV 4 Sélection des mutants	39.
IV 4.1 Sélection dans Milieu MM	41.
IV 4.2 Sélection dans Milieu LB contenant antibiotiques	41.
V.DISCUSSION	42
CONCLUSION	43

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Une mutation est un événement imprévu qui entraîne une modification d'un trait héréditaire. Ces occurrences sont rares et sont souvent perçues comme des anomalies du processus.

Dans cette étude, nous avons utilisé un agent mutagène physique, à savoir les rayons ultraviolets (UV), pour induire des mutations chez *E. coli* et *Proteus mirabilis*. Nous avons constaté que l'exposition prolongée aux UV entraînait la sensibilité et la mort des cellules bactériennes. De plus, des tests de sensibilité aux antibiotiques réalisés avant et après l'exposition aux UV ont révélé une induction de résistance des bactéries aux antibiotiques après cette exposition.

La mutagenèse par UV a mis en évidence la sensibilité et la mortalité des cellules bactériennes après une exposition prolongée aux UV.

Mots clés : mutagenèse, rayons ultraviolets, *Escherichia coli*, *Proteuse mirabilis*.

Antibiotique

Summary

A mutation is an unforeseen event that causes a change in a hereditary trait. These occurrences are rare and often perceived as anomalies in the process.

In this study, we used physical mutagens, ultraviolet (UV) light, to induce mutations in *E. coli* and *Proteus mirabilis*, in the absence of chemical mutagens. We found that prolonged UV exposure led to sensitivity and death of bacterial strains. In addition, antibiotic sensitivity tests performed before and after UV, exposure revealed increased resistance of bacteria to many antibiotics after this exposure.

UV mutagenesis demonstrated the sensitivity and mortality of strains after prolonged UV exposure. .

Keywords : mutagenesis, UV rays, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ,Antibiotic.

المخلص

الطفرة هي حدث غير متوقع يؤدي إلى تغيير في الصفة الوراثية. هذه الأحداث نادرة وغالبًا ما يُنظر إليها على أنها حالات شاذة في العملية. في هذه الدراسة، استخدمنا المطفرات الفيزيائية، بما في ذلك الضوء فوق البنفسجي، للبحث على حدوث طفرات في الإشريكية القولونية والمتقلبة الرائعة، في غياب المطفرات الكيميائية. لقد وجدنا أن التعرض للأشعة فوق البنفسجية لفترة طويلة أدى إلى حساسية وموت السلالات البكتيرية. بالإضافة إلى ذلك، كشفت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية التي تم إجراؤها قبل وبعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية عن زيادة مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية بعد هذا التعرض للطفرات فوق البنفسجية، وأظهرت حساسية السلالات وانخفاض في نسبة الحياة (زيادة في نسبة الوفيات) بعد التعرض لفترة طويلة للأشعة فوق البنفسجية

الكلمات المفتاحية : إحداث الطفرات، الأشعة فوق البنفسجية، البكتيريا القولونية، المضادات الحيوية.

Introduction

INTRODUCTION

Les particularités de chacun sont essentiellement explicables par l'ADN qui, comme un plan d'architecte, codifie tout notre organisme. Mais il n'est pas figé et peut évoluer sous l'influence de son environnement. L'ADN code également les risques de développer certaines maladies. **(Cea,2007)** Il arrive que des erreurs se glissent dans ces recettes. On parle alors de mutation génétique. Ces mutations se produisent lorsque l'ADN est modifié ou endommagé. Et quand la recette change, les cellules ne comprennent plus aussi bien la commande qu'elles doivent exécuter. Autrement dit, les gènes mutés ne remplissent plus leur rôle correctement, et cela peut avoir un impact lors de la division des cellules. Toutes sortes de phénomènes peuvent provoquer des mutations dans un gène. Certaines mutations sont inoffensives, mais d'autres peuvent augmenter le risque de cancer **(procur,2023)** Dans le spectre électromagnétique, le rayonnement ultraviolet UV est classifié comme ayant une longueur d'onde comprise entre 100 nm et 400 nm. Ces longueurs d'ondes sont plus courtes que celles de la lumière visible et plus longues que celles des rayons X. Il existe trois classifications de la lumière UV : les UVA ont des longueurs d'ondes comprises entre 315 nm et 400 nm, les UVB ont des longueurs d'ondes comprises entre 280 nm et 315 nm, et les UVC ont des longueurs d'ondes comprises entre 100 nm et 280 nm **(Rich,2022)**. Le rayonnement UV a un impact sur la santé humaine, à la fois positif et négatif. Une exposition trop importante peut être nocive, tandis qu'une exposition modérée a des effets bénéfiques. **(Rich ,2022)**.les rayons ultraviolets dans la région 240~280 nm ont un pouvoir bactéricide plus fort. Ce produit peut tuer efficacement les bactéries sur la sonde b-ultrasons dans les 10 ~ 30s. **(Hubie ,2009)**. L'exposition prolongée aux rayons UV joue un rôle dans le développement de la cataracte et d'autres maladies oculaires responsables d'une grande partie des déficiences visuelles dans le monde. Des réactions cutanées anormales dues à la sensibilité à la lumière, telles que des photo dermatoses et des réactions photo toxiques aux médicaments, peuvent également se produire **(Lucas et al,2019)**. Cependant, de petites quantités de rayonnement UV sont essentielles à la synthèse de la vitamine D nécessaire à la santé des os et à la fonction immunitaire, avec des avantages pour les maladies de la peau telles que le psoriasis **(Lucas et al., 2019)**.Le stérilisateur médical à ultrasons ultraviolets utilise des rayons ultraviolets de 280 nm pour désinfecter et stériliser. Le rayon ultraviolet est une sorte d'onde lumineuse invisible, qui existe en dehors de l'extrémité du spectre du rayon ultraviolet.

Dans cette étude, deux Souches différentes de bactéries *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* ont été exposées au rayonnement ultraviolet pendant une Période de temps (16min).

Le contenu de cette mémoire est organisé en cinq chapitres :

➤ Les deux premiers chapitres présenteront une brève revue de littérature sur les bactéries, L'ADN et la mutagénèse, ainsi qu'une étude spécifique sur les bactéries utilisées dans cette recherche, à savoir *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*

➤ Le troisième chapitre détaillera les outils méthodologiques utilisés dans cette étude.

➤ Le quatrième chapitre présentera les résultats de nos recherches.

➤ Le cinquième chapitre sera consacré à la discussion de notre travail.

➤ Enfin, une conclusion générale sera proposée pour conclure.

CHAPITRE I

Les Bactéries

I.1. Histoire et définition des bactéries

Dans une infusion de poire, avec un microscope rudimentaire, Antoine van Leeuwenhoek, obscur drapier de Delft, fut le premier être humain à observer des bactéries. Cette incroyable découverte date du 10 juillet 1676, et pourtant, les microbes furent les premières créatures vivantes apparues sur terre il y a plus de trois milliards d'années. D'êtres unicellulaires, les microbes ont évolué vers des organismes complexes qui ont donné naissance aux plantes, aux animaux et aux hommes (**Patricke ,2007**).

Les bactéries sont des organismes unicellulaires microscopiques. Elles font partie des premières formes de vie connues sur terre. Il en existe des milliers de types différents, et elles vivent dans tous les environnements possibles, partout dans le monde. Elles vivent dans la terre, dans la mer et dans les profondeurs de la croûte terrestre. On a même rapporté que certaines bactéries vivaient dans les déchets radioactifs. De nombreuses bactéries vivent sur et dans le corps de l'homme et des animaux (au niveau de la peau et dans les voies respiratoires, la bouche, le tube digestif, les voies génito-urinaires) sans causer de préjudices. De telles bactéries sont appelées flore résidente, ou micro biome. Il existe au moins autant de bactéries dans la flore résidente qu'il existe de cellules dans l'organisme. La plupart des bactéries de la flore résidente sont en fait utiles à l'homme, par exemple, en aidant à la digestion des aliments ou en empêchant la croissance d'autres lus dangereuses. (**Larry, 2022**)

I.2. Croissance et culture des bactéries

L'estimation de la croissance bactérienne est basée sur deux critères, la masse cellulaire et le nombre de bactéries, qui augmentent dans des proportions variables au cours de la croissance. La masse cellulaire est mesurée selon la densité optique du milieu, tandis que le nombre de bactéries viables est estimé d'après le nombre d'unités formant colonie sur milieu de culture solide,ensemencé à partir de suspensions, diluées en série, de la culture.(**Michel,2007**)

I.3. Structure cellulaire

Il existe des millions de différents types de bactéries dans le monde. C'est pourquoi il est important de se doter d'un système permettant de les répertorier. Les scientifiques classent généralement les bactéries en fonction de deux caractéristiques :

- L'épaisseur de leur paroi cellulaire
- Leur forme.

Pour déterminer l'épaisseur des parois cellulaires bactériennes, les scientifiques utilisent une technique appelée coloration de Gram. Ils teignent les bactéries Avec un colorant appelé cristal violet. Une paroi cellulaire épaisse conservera sa couleur violette, contrairement à une paroi mince.

Les bactéries à **Gram positif** ont des parois cellulaires épaisses. Lorsqu'elles sont colorées, elles apparaissent bleues ou violettes.

Les bactéries à **Gram négatif** ont des parois cellulaires minces. Lorsqu'elles sont colorées, elles apparaissent roses ou rouges. (Bruckner, 1993)

I.4. Morphologie des bactéries

Différents types de microbes ont des formes différentes, mais caractéristiques. Dans Des conditions appropriées, la forme et la taille des microbes sont relativement stables. Il est Important de connaître la structure morphologique des microbes, car elle nous permet de Mieux comprendre la physiologie microbienne, les mécanismes pathogènes, les Caractéristiques antigéniques et nous permet de les identifier par espèce. De plus, la Connaissance de la morphologie microbienne peut être utile pour diagnostiquer la maladie et Prévenir les infections microbiennes :Les bactéries sont des microbes complexes et très variables. Ils se présentent sous Quatre formes de base : sphérique (Cocci), en forme de bâtonnet (bacille), en forme d'arc (Vibrion) et en spirale (spirochète) (Atlas , 2015).

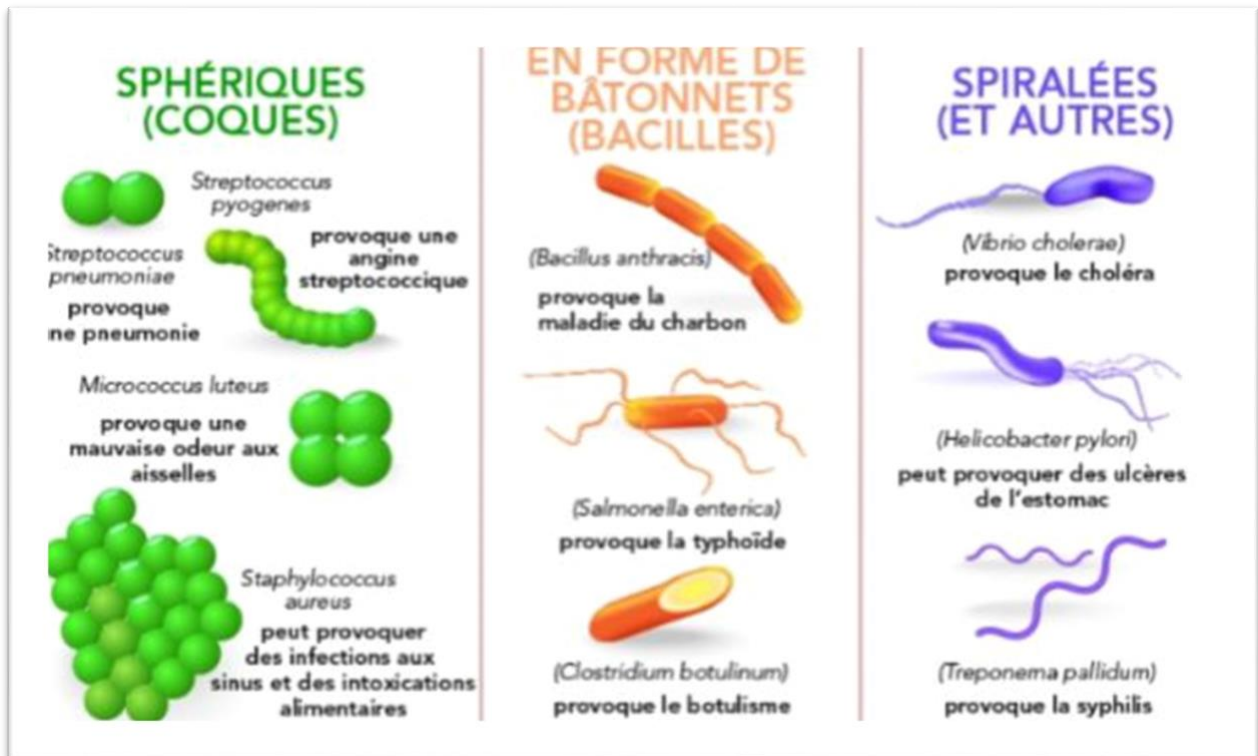


Figure 1 : les formes des bactéries (Bailey, 2019)

I.5. la bactérie : *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli*, décrite pour la première fois par le pédiatre allemand Theodore Escherich à la fin du XIXe siècle (Escherich, 1885), est désormais bien connue sous ce nom. Elle appartient à l'espèce *Bacterium coli* commune et a été isolée à partir des selles de bébés nourris exclusivement au lait maternel. (Delphine, 2008). *E. coli* est une bactérie établie dans le tube digestif des humains et des animaux à sang Chaud. La plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives et seules quelques-unes sont pathogènes et entraînant alors des gastroentérites, infection urinaire, méningites ou septicémie (Kaper, 2004). Le tractus digestif constitue son habitat primaire. La bactérie *E. coli* est présente Principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations supérieures à 10⁶ UFC/g de contenu intestinal. Elle demeure très souvent dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif qui constitue une niche écologique favorable Pour son développement de par ses conditions de température, d'humidité et de disponibilité en Nutriment (Chalmers et al, 2000).

I.5.1 Historique et l'habitat

En 1885, un médecin allemand du nom de Theodore Escherich a identifié pour la première fois La bactérie *Escherichia coli* dans des selles de nourrissons, en inventant le terme *Bacterium coli* Commune (Mainil, 2003). Castellani et Chambers lui ont donnée son nom actuel, en 1919.

Depuis lors, *E. coli* est devenu la bactérie la plus étudiée (Ayad,2017). En termes d'habitat, *E. Coli* est abondante dans la flore commensale, notamment dans le tube digestif. Elle est également Très répondeuse à l'environnement, tels que l'eau, le sol, et la nourriture (Baraduc et al,2000). Le nom commun colibacille attribué à *E. coli* est une contraction du cœlon Bacille qui fait référence à sa localisation dans le tube. Cette bactérie est l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie (10⁷ A 10⁸ UFC/g de selle chez l'adulte). Elle peut devenir pathogène si Les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel et Vildé, 2005).

I.5.2 Taxonomie

L'espèce *Escherichia coli* appartient au genre *Escherichia* de la famille Enterobacteriaceae, Qui à son tour fait partie de l'ordre des Entérobactéries, de l'embranchement des Protéobactéries γ rattaché au règne des bactéries (Greatorex et Thorne,1994) *E. coli*, et plus globalement les coliformes, sont recherchés dans les aliments comme Indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournissant une indication sur l'éventuelle Contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive, notamment les Salmonelles (Laskin et lechevalier, 1994). L'espèce *Escherichia coli* appartient au genre *Escherichia* de la famille Enterobacteriaceae, Qui à son tour fait partie de l'ordre des Entérobactéries, de l'embranchement des Protéobactéries γ rattaché au règne des bactéries (Greatorex et thorne., 1994)

I.5.3 Classification

- Règne : Procaryote
- Domaine : Bactérie
- Phylum : Proteobacteria
- Classe : Gammaproteobacteria
- Ordre : Entérobactérie
- Famille : Enterobacteriaceae
- Genre : *Escherichia*
- *Escherichia coli*

La classification d'*Escherichia coli* (Bergey's, 2012).

I.5.4 Caractères bactériologiques :

I.5.5.1 Caractères morphologiques :

Escherichia coli, membre des Entérobactéries, est une bactérie fine et allongée, Gram négatif, à faculté aéroanaérobie, sporulée, mesurant de 2 à 4µm de long sur 0,4 à 0,6µm de large, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce micro-organisme peu exigeant se cultive facilement sur des milieu ordinaires. Environ 18 à 24 heures après incubation sur des milieux solides, les colonies présentent des caractéristiques arrondies, lisses, brillantes et homogènes, avec des bords réguliers et un diamètre de 2 à 3 mm. Développe également sur des milieux sélectifs pour entérobactéries tels que Mac Conkey et Drigalski. (Figure 2). (Mendaci et Mihoubi, 2015)

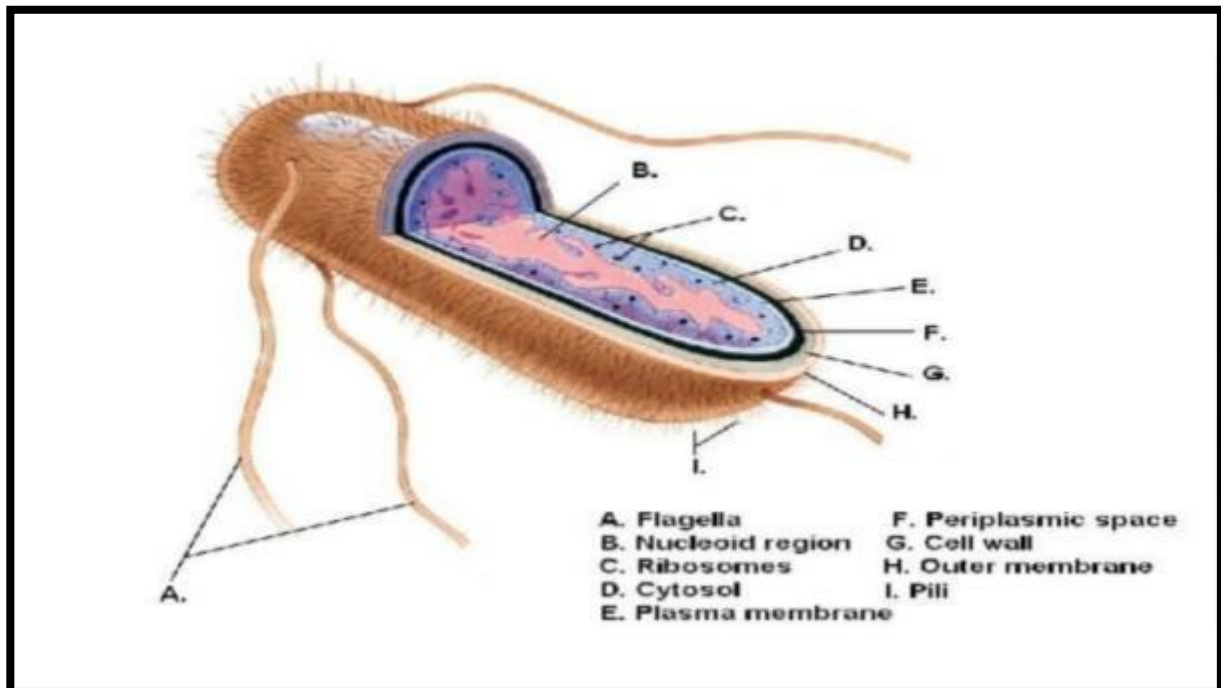


Figure 2 : Morphologie et structure de la bactérie *Escherichia coli* (Soumaila, 2012)

I.5.5.2. Caractères biochimiques :

E. coli est classée dans la famille des Enterobacteriaceae. Elle partage les caractéristiques typiques de cette famille : elle est un bacille Gram négatif, non sporulé, habituellement mobile grâce à des flagelles péritriches. Elle peut vivre dans des environnements aérobies ou anaérobies facultatifs, avec un métabolisme respiratoire et fermentaire. Elle est négative pour l'oxydase, positive pour la catalase et positive pour la réduction des nitrates (Tableau 1). (Bidet et bingen, 2011).

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'*Escherichia coli* (Flaudrois, 2004)

Test	Glu	Lac	H ₂ S	Gaz	CS	GEL	MAL	LDC	NTI	ODC	ADH	URE
Résultat	+	+	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-

I.5.5.3 Caractères antigéniques

D'après la classification antigénique des entérobactéries, *E. coli* présente une diversité d'antigènes liés à quatre types de structures, comme rapporté (Vaish *et al.* 2016, Vidic *et al.*,2017).

Les antigènes somatiques de type O sont stables à la chaleur et associés aux lipopolysaccharides de la paroi cellulaire.

Les antigènes flagellaires de type H, présents chez les souches mobiles, sont thermosensibles et liés aux protéines des flagelles.

Les antigènes de surface de type K, aussi connus sous le nom d'antigènes de capsule ou d'enveloppe, sont principalement des polysaccharides. Ils masquent les antigènes somatiques de type O et entravent le sérotypage en leur présence. Parmi ces antigènes de type K, l'antigène L est thermosensible et le plus courant. Un chauffage à 100°C pendant une demi-heure le détruit, exposant ainsi l'antigène O pour le sérotypage.

L'antigène A est plus rare et résiste à une température de 100°C. Seul un autoclavage à 121°C pendant une heure permet de le démasquer. Quant à l'antigène B, sa thermolabilité est intermédiaire entre les antigènes L et A. Un chauffage à 100°C permet le sérotypage, mais une exposition prolongée peut le détruire totalement. (Dembel,2006).

I.5.5.4 Caractères cultureux

E. coli est une bactérie mésophile, son optimum de croissance est proche de la Température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C). La limite de croissance Inférieure se situe aux environs de 7°C (Hanes, 2003). Sur gélose nutritive : apparue sous forme de colonies arrondies, humides, brillantes et de Couleur blanchâtre ou légèrement jaunâtre lisse (S) ou rugueuse ® ou parfois muqueuses (Figure 3). (Denis ,2007).



Figure 3: Aspect de *Escherichia coli* sur milieu Mac Conkey (Alain .2015)

I.6 La bactérie : *Proteus mirabilis*

I .6.1 Généralité

Les espèces de *Proteus* sont des membres de la famille des Enterobacteriaceae. (Hamilton ,2018) Gustav Hauser a découvert le genre en 1885, mais depuis, il a été divisé en plusieurs espèces, dont *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri*, ainsi que trois espèces génomiques sans noms (numérotées 4, 5 et 6) (Drzewiecka,2016). Au cours du XXe siècle, la classification des bactéries du genre *Proteus* a évolué. Actuellement, le genre *Proteus* est classé dans la famille des Enterobacteriaceae, faisant partie de l'ordre Entérobactérales, qui inclut notamment l'espèce *Proteus mirabilis*. (Bergey's ,1998)

I .6.2 Classification

- Règne : Bacteria.
- Embranchement : Protoeubacteria.
- Classe : Gamma Proteobacteria.
- Ordre : Entérobactériale.
- Famille : Enterobacteriaceae.
- Genre : *Proteus*.
- Espèce : *Proteus mirabilis* (Bergey's ,1998).

I.6.3 Habitat

Les microorganismes du genre *Proteus* sont souvent présents dans divers environnements naturels tels que les eaux souillées, les sols et le fumier. Leur capacité à décomposer les matières organiques, y compris par l'hydrolyse de l'urée et la désamination oxydative des acides aminés, en fait des acteurs importants dans le processus de décomposition des matières organiques d'origine animale (**Leulmi, 2015**). Elles jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique provenant des animaux, ce qui les conduit fréquemment à être trouvées dans les excréments humains et animaux. (**Janda et Abbot, 2006**). Environ un quart de la population humaine sont porteurs intestinaux de *Proteus*. Les patients peuvent être infectés par leur propre flore (auto-infection). Ces bactéries sont souvent des résidents fréquents du tube digestif humain et animal. Les infections peuvent aussi se propager par contact avec des bactéries provenant d'autres individus ou d'une source commune (**Holt, 1986**).

I.6.4 Aspect morphologique

Les bactéries de l'espèce *Proteus mirabilis* se présentent sous la forme de petits bacilles Gram négatif, généralement très mobiles, avec une morphologie polymorphe. Elles mesurent de 0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 1,0 à 80 µm de longueur et sont très flagellées. Elles alternent entre des phases de nage individuelle et des phases de grouillement hyper-flagellé. (**Belas, 1996**). Le *Protée mirabilis* peut s'étendre et libérer un polysaccharide lorsqu'il est en contact avec des surfaces solides, ce qui le rend très mobile sur des surfaces comme les équipements médicaux. Il se distingue par sa capacité de nage en essaim, sa capacité à fermenter le maltose et son incapacité à fermenter le lactose. (**Liu, 2010**). *Proteus mirabilis* peut présenter deux formes morphologiques et physiologiques distinctes : les cellules de nage et les cellules grouillantes. En suspension aqueuse, elles adoptent la forme de nageurs, de petites cellules en forme de tige d'environ 2 µm de longueur, dotées de 8 à 10 flagelles pour la motilité. Lorsqu'elles entrent en contact avec une surface, elles se transforment en cellules grouillantes, s'allongeant considérablement pour former des filaments flagellés de 20 à 80 µm de longueur. Ces cellules s'alignent en parallèle pour former des radeaux capables de se déplacer rapidement en masse sur les surfaces. Sur des surfaces semi-solides comme la gélose, elles forment des anneaux concentriques de croissance. (**Pearson, 2008**).

I .6.5 Caractères cultureux

Sur les géloses nutritives ou au sang incubées à 37°C, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* et parfois *P. penneri* peuvent coloniser la surface des milieux de culture en formant des halos concentriques, des motifs en hérisson ou en fil barbelé, selon le degré d'envahissement. (Schultz, 2018).

1.7 Résistance bactérienne

La résistance aux antimicrobiens est un concept relatif, avec de nombreuses définitions de la « résistance bactérienne aux antibiotiques » basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques, cliniques) qui peuvent différer. Les critères microbiologiques se basent sur la résistance in vitro, tandis que les critères cliniques se réfèrent à la résistance in vivo. En microbiologie, une souche est considérée résistante si elle se développe en présence d'une concentration plus élevée d'antibiotique par rapport à d'autres souches similaires. La résistance ne peut être évaluée que par comparaison entre au moins deux souches, dont l'une est souvent une souche sauvage, prélevée dans la nature, et l'autre cultivée en laboratoire dans des conditions similaires. En clinique, une souche est qualifiée de résistante si elle survit à une thérapie antibiotique. (Muylaert et Mainil, 2012).

1.7.1. Types de résistance aux antibiotiques

1.7.1.1 Résistance naturelle (intrinsèque)

La résistance naturelle est un trait présent chez toutes les souches d'une même espèce. Elle est détectée dès les premières études sur un antibiotique pour évaluer son activité et définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut résulter de l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, de sa faible affinité pour celui-ci, ou même de son absence. La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. Elle reste stable et est transmise à la descendance lors de la division cellulaire (transmission verticale), mais elle n'est généralement pas transférable entre différentes bactéries (transmission horizontale). (Sylvie, 2009).

1.7.1.2 Résistance acquise (extrinsèque)

C'est un phénomène qui ne concerne qu'un nombre limité (ou parfois un grand nombre) de souches d'une espèce donnée. La résistance acquise peut être moins stable, mais elle a tendance à se propager largement dans le monde bactérien. Elle résulte d'une altération du matériel génétique de la bactérie, lui permettant de survivre à des concentrations d'antibiotiques plus élevées que celles qui inhibent les souches sensibles de la même espèce. Sur le plan génétique, cette résistance peut être acquise de deux manières différentes : par des mutations touchant les

gènes présents sur le chromosome ou par l'acquisition de gènes étrangers. Ces gènes peuvent provenir du chromosome d'espèces différentes ou être transportés par des éléments génétiques mobiles pouvant être transférés d'une bactérie à une autre. (Lozniewskai,2010).

1.7.3 Mécanismes de résistance bactérienne

Escherichia coli a plusieurs mécanismes de résistance représentés dans la (figure 5)

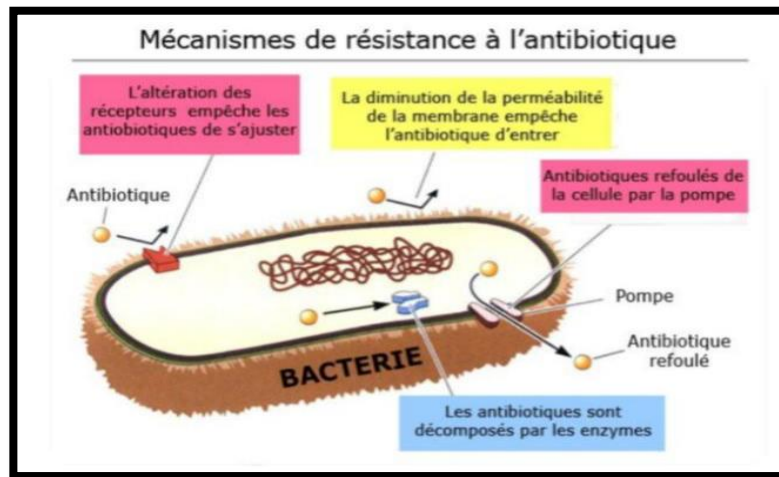


Figure 4 : Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux antibiotiques (Haubrug,2008)

1.7.3.1 Inactivation ou dégradation des antibiotiques par des enzymes

Mécanisme est basé sur la destruction d'un antibiotique avant même que celui-ci pénètre la cellule. Il se produit via la sécrétion par la bactérie d'une enzyme capable de détruire des liens chimiques nécessaires à l'intégrité fonctionnelle du médicament. C'est donc une stratégie offensive par laquelle la bactérie inactive l'antibiotique. Les bêta-Lactamases sont un exemple d'enzymes produites par les bactéries qui inactivent les b-Lactamines telles les pénicillines et les céphalosporines. D'autres catégories d'enzymes inactivent plus précisément les aminosides ou d'autres antibiotiques, incluant le Chloramphénicol et la fosfomycine (Véronique ,2003).

1.7.3.2 Diminution de perméabilité

Tout changement dans la composition de l'enveloppe cellulaire, qui fait obstacle à l'absorption d'un antibiotique donné, aura pour résultat une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou l'apparition d'un haut degré de résistance, la réduction de la perméabilité cellulaire se produit par diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site, provoquée par une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. Une altération des porines dans la paroi des bactéries à gram négatif peut réduire ou bloquer la pénétration de l'antibiotique jusqu'à son site d'action. (Courvalin , 2006)

1.7.3.3 Acquisition d'un déterminant de résistance exogène

Des gènes spécifiant une résistance à un ou à plusieurs antibiotiques peuvent être Acquisés par transformation, conjugaison, transposition conjugative ou transduction. Dans certains cas, une <<cassette génétique>> codant pour la résistance aux antibiotiques s'insère par recombinaison localisée dans une séquence spécifique de l'ADN (intégron). Un intégron comprend le site d'insertion et aussi l'intégrase (recombinase) requise (Courvalin ,2006)

1.7.3.4. Résistance inductible

Lorsque la concentration d'antibiotiques dépasse un seuil minimum, certains peuvent provoquer la résistance dans les cellules bactériennes. Par exemple, chez les bactéries Gram-positives comme les staphylocoques, la présence de chloramphénicol induit la formation de chloramphénicol acétyltransphérase, une enzyme qui catalyse l'acétylation, entraînant ainsi l'inactivation de l'antibiotique. (Courvalin , 2006)

1.7.4 Multirésistance

La multirésistance bactérienne résulte de l'accumulation de résistance à un nombre Important d'antibiotiques appartenant à des familles variées. Les deux sens les plus communément acceptés de la multirésistance bactérienne tournent autour de bactéries qui sont résistantes à de nombreux antibiotiques ou qui sont résistantes beaucoup plus d'antibiotiques que la résistance du phénotype sauvage ne le laissait prévoir. On voit que le premier concept s'adapte bien aux bactéries pour les quelles on parle de résistance naturelle. Ce sont celles qui ont, de tout temps et en tout lieu, été résistantes à de nombreux antibiotiques. Le deuxième des concepts énoncés plus haut s'adapte bien aux bactéries dont le phénotype de résistance s'est modifié de façon importante au cours du temps, Celles pour lesquelles on parle de résistance acquise. (Hygis ,1998).

1.8 l'antibiotique

Du grec anti-« contre » et bios «la vie ». Les antibiotiques sont des substances Antibactériennes élaborées par des microorganismes, champignons et diverses bactéries. Elles sont soit d'origine biologique, synthétique ou semi-synthétique, capables d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (Muylaert et Mainil, 2012). Ces substances ont le pouvoir d'inhiber (action bactériostatique) et/ou même de détruire les bactéries (action bactéricide) (Calhoun et al ,2021)

1.8.2 Effets des antibiotiques

1.8.2.1 Antibiotique bactériostatique

Quand il inhibe seulement la croissance et la multiplication des bactéries : l'infection ne sera finalement vaincue que par les défenses naturelles de l'organisme. (Stora ,2013).

1.8.2.2 Antibiotique bactéricide

Quand il détruit les germes. L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique Définie son spectre : plus un antibiotique détruit des types différents de bactéries, plus son Spectre (Stora . 2013).

1.8.2.2.1 Antibiotique à spectre large

Il s'agit d'un antibiotique efficace sur un grand nombre de types de germes. Ainsi, l'antibiotique sera actif sur une grande partie de tous les Cocci et de tous les bacilles. Les bacilles Gram⁻ sont les plus nombreux. D'une manière indirecte, un spectre large est forcément actif sur les bacilles Gram⁻. Les antibiotiques à spectre large seront utilisés lorsque le germe n'est pas identifié et que la pathologie peut être due à différents types de germes. (Stora ,2013).

1.8.2.2.2 Antibiotique à spectre étroit

Il s'agit d'un antibiotique efficace sur un nombre limité de types de germes. Cette spécificité lui permet ainsi de cibler un germe est une pathologie. (Stora, 2013).

1.8.2.2 .3 Antibiotique à spectre moyen ou limité

Il s'agit d'un antibiotique dont l'efficacité est réduite ou partielle sur un groupe de germes. Il concerne aussi un spectre anciennement large et réduit par l'apparition de Résistance bactérienne (Stora, 2013)

1.8.3 Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques sont conçus pour cibler spécifiquement les micro-organismes pathogènes sans nuire aux cellules de l'hôte. C'est un principe fondamental pour assurer l'efficacité du traitement tout en minimisant les effets secondaires indésirables. (Smaoui,2010)

1.8.3.1 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

Certaines bactéries sont protégées de l'environnement extérieur par une paroi, qui doit croître quand la bactérie se divise, cette paroi contient en particulier une couche de peptidoglycane plus ou moins épaisse. La pénicilline et les antibiotiques chimiquement

apparentés empêchent la réaction de transpéptidation qui est une étape importante dans l'assemblage du peptidoglycane, polymère de la paroi cellulaire. Ceci entraîne la fragilisation de la paroi cellulaire, notamment chez les micro-organismes Gram positif. Les micro-organismes vivant généralement dans un environnement osmotiquement hostile, et ce qui, avec une paroi défectueuse, pourront absorber de l'eau et éclater ou se lyser. Les bactéries Gram négatives ont tendance à être moins sensibles à la pénicilline car leur enveloppe externe empêche l'antibiotique d'atteindre la couche de peptidoglycane de la cellule. (Sedrati, 2014)

1.8.3.2 Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique

Il existe un certain nombre de molécules antibiotiques qui agissent sur la membrane des cellules. Ces molécules sont essentiellement des détergents (ou surfactants) qui désorganisent la bicouche phospholipidique membranaire, provoquant une fuite des composés hydrosolubles du cytosol et la mort de la bactérie ; la polymyxine en est un exemple. (Clos, 2012)

1.8.3.3 Antibiotiques qui effectuent une inhibition de la synthèse protéique

C'est le cas par exemple des tétracyclines, aminosides, chloramphénicol, macrolides, acide fusidique, linézolide. Ceux-ci se fixent sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien. Ils empêchent ou gênent la traduction des ARNm (une "copie" d'un gène, destiné à être lu par les ribosomes pour permettre la synthèse d'une protéine) donc la formation de nouvelles protéines

- Inhibition de la réplication de l'ADN/ ADN polymérase
- inhibition de la transcription/ARN polymérase
- diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques (Clos, 2012)

1.8.3.4 Antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques

Les rifampicines, sulfamides, quinolones et triméthoprime inhibent la synthèse ou même le fonctionnement des acides nucléiques de différentes façons selon les familles d'antibiotiques. (Clos, 2012)

1.8.4 Classification

La classification par familles des antibiotiques prend en considération la composition chimique des molécules et leur mode d'action au niveau moléculaire, en relation avec les différentes structures de la cellule bactérienne. Cette classification évolue avec l'apparition de nouvelles molécules. À l'intérieur de chaque famille, la subdivision en groupes se base sur le

spectre bactérien couvert et les propriétés pharmacocinétiques de l'antibiotique. (Gazengel, 2013)

Tableau 2 : Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane (Bennani, 2014).

	Spectre	Type d'action	Mode d'action
Vancomycine	Large	Bactéricide	Inhibition de la pyruvyltransférase
Betalactamine	Etroit	Bactéricide	Fixation sur les 2 derniers acides aminés (D-ala) constituant le précurseur de peptidoglycane
Betalactamine	Selon le groupe	Bactériostatique et Bactéricide	Fixation et inhibition des PLP (Protéines Liant les Pénicillines)

1.9 Antibiogramme

L'antibiogramme est une méthode de travail microbiologique, utilisant un milieu Gélose spécifique en boîte de pétri et des disques imprégnés d'antibiotiques à des Concentrations déterminés. Cette méthode permet d'évaluer la sensibilité d'une bactérie Pathogène vis-à-vis d'antibiotiques choisis en fonction des indications cliniques fournies et de La prévalence de la résistance acquise. En mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques Et en consultant les tableaux << de concentrations, diamètres critiques et règles de lecture Interprétative >> pour des familles ou des genres bactériens déterminés, on peut savoir si, Pour ces antibiotiques testés, une souche bactérienne est sensible, intermédiaire ou résistante. La mesure du diamètre d'inhibition représente la valeur de la CMI de l'antibiotique (Delarras, 2014)

CHAPITRE II

ADN et Mutagenèse

II.1 ADN

L'ADN est le support de l'information génétique dans presque tous les êtres vivants (**Avery et al,1944**). Khorana (1961) a décrit la séquence d'acides aminés contenue dans l'adn . En effet, tous les êtres vivants qu'il s'agisse d'animaux, de plantes, de bactéries ou de la plupart des virus, . Par conséquent, l'étude de toute forme de vie a été Suivie par l'étude de la structure »t de la fonction de la vie de cette molécules (**Griffith et al,2001**).

II.1.2 Le rôle d'ADN

L'ADN est la molécule qui porte le code génétique d'un individu, c'est-à-dire toutes les informations nécessaires à la fabrication et au développement d'un être vivant. L'ADN permet la production des protéines (**Giorgetta,2021**).

II.1.3 Acides nucléiques : Les molécules clés de l'information génétique

Il existe deux grandes catégories d'acide nucléique à l'état naturel : les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN).

Les acides désoxyribonucléiques, ADN, (anciennement appelés "thymonucléiques" ont d'abord été isolés du thymus) constitués de nucléotides à désoxyribose et localisés dans tous les noyaux cellulaires où on les trouve unis à des protéines basiques (protamines ou histones).On rencontre aussi des ADN dans les bactéries, dans les mitochondries et dans les chloroplastes des eucaryotes. Ils sont le support des caractères géniques dans les chromosomes. Les acides ribonucléiques, ARN, (anciennement appelés "zymonucléiques" parce qu'ils ont été isolés de la levure) sont constitués de nucléotides à ribose. On en trouve de masses moléculaires très différentes dans les noyaux cellulaires, dans les ribosomes et même en petite quantité dans le liquide cytoplasmique (acides nucléiques solubles). Les acides nucléiques diffèrent par leur composition en bases (adénine, guanine, cytosine, uracile, thymine) et surtout par leur disposition séquentielle dans l'enchaînement polynucléotidique. On explique ainsi qu'ils soient porteurs de l'information spécifique nécessaire à la biogénèse des protéines. Les acides nucléiques sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans les solutions alcalines diluées ou dans les solutions salines en donnant une solution de viscosité élevée. Ils sont dépolymérisés par des enzymes spécifiques, les ribonucléases et les désoxyribonucléases. (**Afmelethon ,2013**)

II.1.4. Structure de l'ADN

II.1.4 .1. Découverte de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick

En 1953, James Watson et Francis Crick ont découvert la structure en double hélice de l'ADN, une découverte qui a révolutionné la biologie moléculaire et a permis de comprendre comment l'information génétique est stockée et transmise. Leur travail a été publié dans la revue Nature en avril 1953 sous le titre "Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribose nucleic acid". Dans cet article, Watson et Crick ont présenté un modèle en trois dimensions de la structure de l'ADN, basé sur des données expérimentales de diffraction des rayons X. La structure en double hélice de l'ADN se compose de deux brins de nucléotides enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice. Les brins sont maintenus ensemble par des liaisons hydrogène entre les bases azotées complémentaires (adénine-thymine et cytosine-guanine), ce qui permet à l'ADN de se répliquer fidèlement lors de la division cellulaire. (Watson et Crick, 1953)

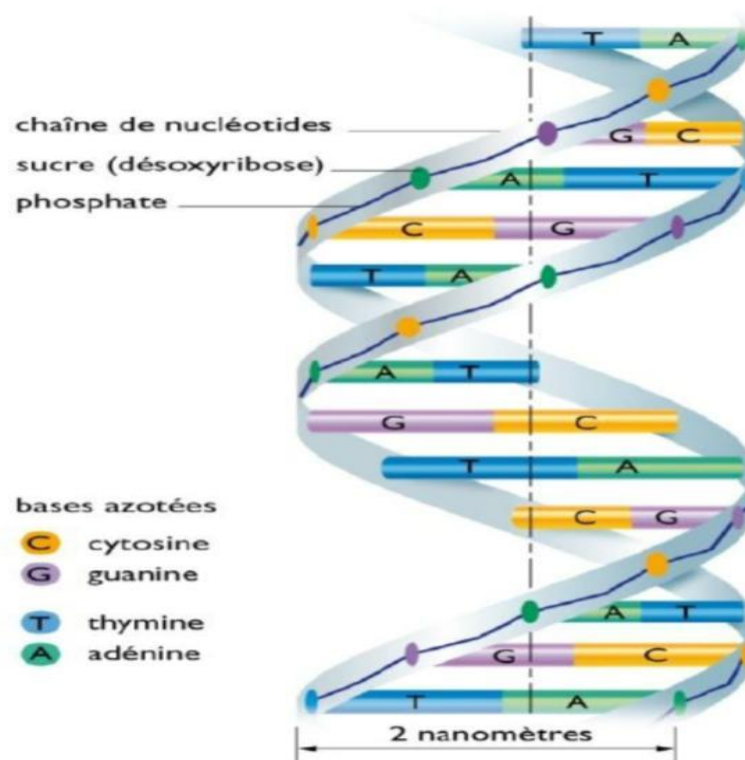


Figure 5: La structure en double hélice de l'ADN (Jebah ,2013).

II.1.4.3 La composition chimique et la structure des acides nucléiques

D'un point de vue chimique, un acide nucléique se compose d'une séquence de nucléotides liés chimiquement. Chaque nucléotide se compose d'une base azotée aromatique, d'un sucre pentose et d'un groupe phosphate. Les bases azotées sont divisées en deux catégories : les purines et les pyrimidines. Les purines, adénine et guanine, se trouvent à la fois dans l'ADN et l'ARN. L'adénine présente un groupe amine ($-NH_2$) en position C6 de l'anneau purique, tandis que la guanine présente un groupe amine en position C2 et un groupe carbonyle en position C6. Les deux pyrimidines généralement trouvées dans l'ADN sont la thymine et la cytosine. La thymine contient un groupe méthyle ($-CH_3$) en position C5 et des groupes carbonyles en positions C4 et C2. La cytosine contient un atome d'hydrogène en position C5 et un groupe amine en position C4. L'uracile est similaire à la thymine mais ne contient pas de groupe méthyle en position C5. L'uracile est un composant de l'acide ribonucléique (ARN), où il est utilisé à la place de la thymine en tant que pyrimidine. Les groupes amines des bases azotées agissent en tant que donneurs d'hydrogène, tandis que les oxygènes des groupes carbonyles et les azotes de l'anneau agissent en tant qu'accepteurs d'hydrogène (Figure 7). (Sinden, 1994).

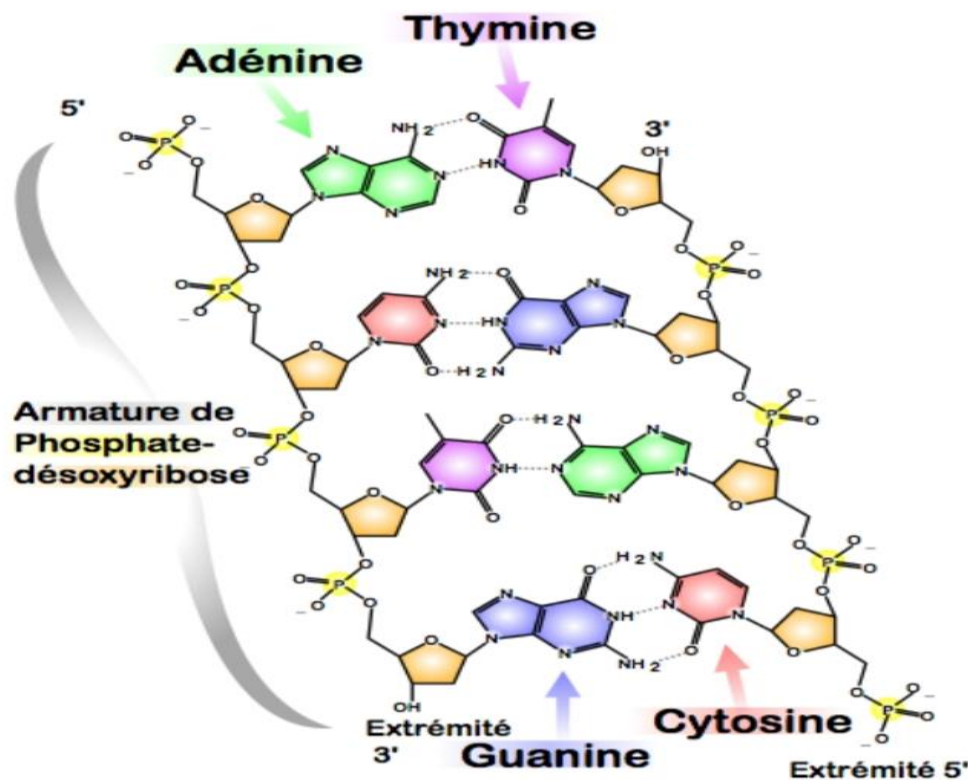


Figure 6 : la composition chimique d'acide nucléiques (Akbar, 2015)

II.1.5 Localisation de l'ADN dans la cellule

Dans les organismes procaryotes tels que les bactéries et la plupart des virus, l'ADN est libre dans le cytoplasme de la cellule. C'est une molécule continue qui reste dans cet état tout au long de la vie cellulaire. En revanche, chez les eucaryotes, majoritairement pluricellulaires, les cellules s'organisent en tissus. Ces tissus sont composés de cellules ayant une structure et une fonction similaires. L'ADN est séparé du reste de la cellule par une membrane nucléaire, formant ainsi le noyau cellulaire. Pendant la phase de repos cellulaire, l'ADN est suspendu dans le noyau sous forme de chromatine, enroulée autour de protéines appelées histones qui soutiennent et régulent l'expression de certains gènes (**Lacan, 2011**). Lors de la division cellulaire, l'ADN s'organise en une forme très condensée appelée chromatine, qui se sépare en un nombre précis de chromosomes. Chaque chromosome est constitué d'une molécule d'ADN (**Fontaine, 2003**)

II.2 Mutations de l'ADN

La mutation est une modification du matériel génétique d'un individu en absence de Confrontation avec un matériel génétique étranger et qui devient par la suite un caractère héréditaire (**Winter et al, 2000**). La position de la mutation sur les gènes est importante. Le changement se traduit Par une variation phénotypique de la cellule, mais qui peut être inaperçue, si elle survient sur une Partie non codante du génome (**Nicklin, et al 2000**). Il peut s'agir d'un changement d'une seule paire de Bases et peut aussi intéresser plusieurs paires de bases. (**Kamoun et al ,2003**).

II.2.2 La mutagenèse dirigée

Procédé qui consiste à introduire une mutation précise dans un site déterminé d'un génome. (**Terme, 2018**)

II.2.3 Les types des mutations

II.2 .3.1 Mutation Faux Sens

Les mutations faux-sens sont des mutations de l'ADN qui entraînent de la séquence d'acides aminés (un mauvais codon et un mauvais acide aminé)Du produit protéique. Celapourrait être causé par un seul point mutation ou une série de Mutations. (**Rao, 2006**).

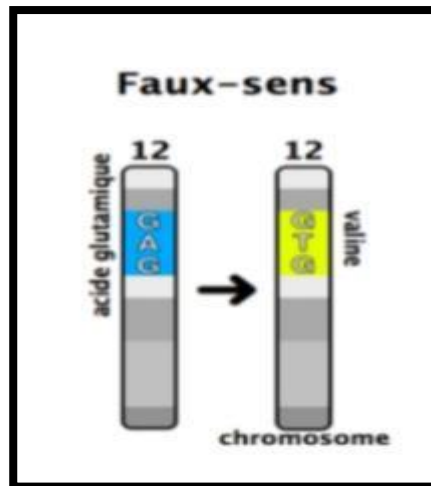


Figure 7 :Schéma de mutation Faux Sens (Chellat , 2021)

II.2.3.22 Mutation non-sens

Les mutations où une chaîne normale est souvent terminée en raison d'une mutation ponctuelle d'un codon normal en un codon stop, UAA, UAC, UGA, sont classées comme des mutations non-sens. La terminaison prématurée d'une chaîne peptidique en croissance entraîne la formation de produits protéiques tronqués. (Mort et al., 2008)

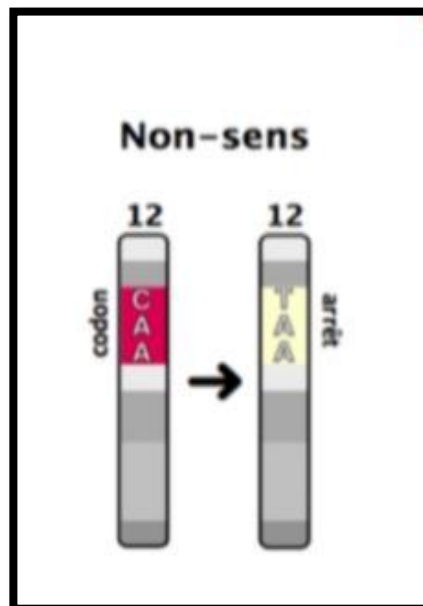


Figure 8: Schéma de mutation non-sens (Chellat , 2021)

II.2.3.3 mutation silencieuse

Les mutations silencieuses ou muettes n'entraînent aucun changement dans la séquence d'acides aminés, ce qui est dû aux nombreuses redondances dans le code génétique. En effet, la troisième base d'un codon n'est en général pas codante (de fait, plusieurs codons différents

codent le même acide aminé). Cette propriété est appelée dégénérescence du codage (**Laubya et Marneg ,2013**)

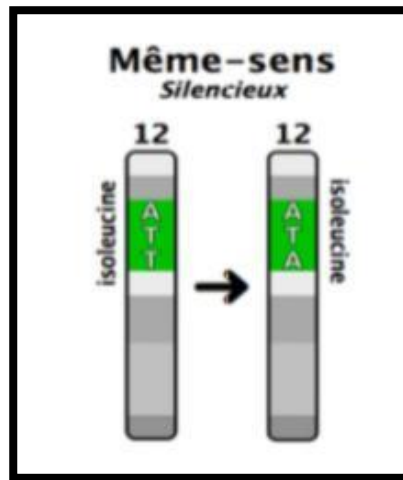


Figure 9: Schéma de mutation même_sens (**Chellat , 2021**)

II.2.3.4 Mutation de décalage de cadre

Certaines anomalies génétiques peuvent décaler d'un ou deux nucléotides le cadre de lecture de l'ARN messager, rendant le message génétique inutilisable pour fabriquer la protéine. (**Amfmentethon,2016**)

II.2 .4 Les conséquences de mutation

Une mutation peut rester silencieuse si elle survient dans une région de l'ADN qui n'est pas transcrite et qui ne joue aucun rôle régulateur. Si elle survient dans une région régulatrice d'un gène. Les insertions ou délétions d'un petit nombre de paires de bases (produites par des mutagènes qui s'intercalent entre les bases, comme les acridines) ont des conséquences très différentes selon que ce nombre est un multiple de 3 ou pas. Dans le cas où le changement ajoute ou délète 3 ou un multiple de 3 paires de bases, un seul ou quelques acides aminés seront différents ou absents, mais la suite de la séquence protéique restera inchangée. Si ce nombre n'est pas un multiple de 3, la phase de lecture est modifiée et la séquence de toute la protéine en aval de la mutation est différente, parfois même un triplet non-sens apparaît peu après et la protéine est tronquée. Dans ces cas, la protéine est inactive. De telles mutations de décalage du cadre de lecture sont facilement inversées par le même processus que celui qui leur a donné naissance : il suffit d'une petite insertion ou délétion d'un nombre de paires de bases restaurant le cadre de lecture initial. Parfois la seconde mutation se produit à côté de la mutation initiale et la séquence de la protéine sauvage est corrigée exactement. Parfois la seconde mutation se

produit a distance et un ou quelques acides Aminés sont modifiées, ce qui peut (ou non) affecter la fonction de la protéine considérée. (Kamoun et al,2003).

II.2.4. les agents Mutagènes

Les mutagènes connus se répartissent en deux groupes : les agents physiques et les agents chimiques. Le premier groupe comprend toutes les radiations ionisantes et certaines parties du spectre de l'ultraviolet. L'effet destructeur des rayons X et γ sur les cellules est en grande partie la conséquence de leur action sur le matériel génétique nucléaire. Les mutagènes chimiques sont très nombreux et variés. Les plus connus sont les corps alkylants, tels que les moutardes et les esters sulfoniques, les peroxydes organiques, l'acide nitreux (Leblon ,2008)

II.2.4.1. Les types d'agents mutagènes

Tableau 3 : les différents types d'agents mutagènes (Etine 2001)

	Type	Exemple
Agent biologique	VIRUS	HIV
Agent physique	Radiation ionisante ou non ionisante	Les ultraviolets (UV) sont absorbés au niveau des bases pyrimidiques, provoquant un dimère et une distorsion au niveau de l'ADN (Vargs ,2001).les rayons X et les rayons γ , génèrent des radicaux libres (OH ⁻ , hydroxyle), oxydent les bases azotées, ce qui induits des mutations
Agents chimiques	Certaines substances Chimiques capables D'altérer la structure et la Complémentarité des bas	L'acide nitreux provoque la désamination de l'adénine, et provoque une transition, Dépurination,Les radicaux libres (ions surepoxydes, radicaux hydroxydes...) peuvent oxyder la guanine (appelé oxo guanine) qui peut s'apparier aussi bien

		avec de l'adénine qu'avec de la cytosine
--	--	--

CHAPITRE III

Matériel et Méthodes

Le but est d'exposer les souches identifiées au rayonnement ultraviolet (UV) pendant des périodes de temps afin de tester leur sensibilité et leur résistance à ces rayonnements, puis de sélectionner les mutations.

III.1 problématique

Les agents mutagènes ont généralement la capacité de causer des dommages à l'ADN, ce qui peut entraîner des mutations génétiques. En l'absence d'agents mutagènes chimiques disponibles, on peut induire des mutations en utilisant des agents mutagènes physiques, tels que les rayons ultraviolets. Quel est l'impact de l'exposition aux rayons ultraviolets sur la mutation et la sensibilité aux antibiotiques des bactéries ?

III.2 Origine des isolats

Dans cette recherche, les souches utilisées ont été obtenues du Laboratoire de Recherche « Microbiologie et biologie Végétale » de l'université de Mostaganem. Après leur isolement, deux souches, à savoir *Escherichia coli* et *Proteus Mirabilis*, ont été choisies pour cette étude. Ces souches ont ensuite été purifiées avant d'être utilisées dans les expériences.

Escherichia. Coli : code ATCC 10876

Proteuse Mirabilis : code ATCC 53659

III.3. Lieu de travail

Ces études ont été faites au laboratoire de recherche microbiologie et biologie végétale (LMBV) universitaire de Mostaganem.

III. 4 Les milieux de cultures :

III. 4.1. Les milieux liquides :

Les milieux liquides utilisés peuvent être des bouillons nutritifs contenant des produits carnés ou protéiques, ou bien des solutions riches en produits synthétiques, sans la présence de gélose. La croissance microbienne se fait dans des tubes, des ballons ou des erlenmeyers, et elle est suivie par turbidimétrie : le milieu, initialement limpide, devient de plus en plus trouble au fur et à mesure que les microorganismes se développent.

III. 4.1.1. Le bouillon LB :

Le bouillon LB, également connu sous le nom de milieu LB, , bouillon ou milieu Luria-Bertani, est un milieu nutritif largement employé pour la culture bactérienne en milieu de laboratoire.

III.4.2 Les milieux solides :**III. 4.1 Le milieu LB :**

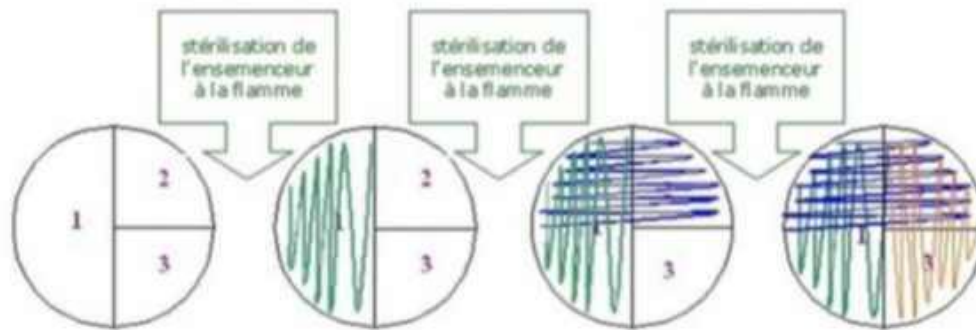
Le milieu LB est adapté à la croissance non sélective des souches d'E. coli pour diverses applications telles que le clonage, la production de plasmides d'ADN et de protéines recombinantes. Il peut également être utilisé pour la culture sélective en ajoutant des antibiotiques appropriés. **(Voir annexe 2)**

III.4.2 Milieu minimum :

Un milieu minimum ou milieu définit est un milieu comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence particulière. **(Voir annexe1)**

III. 5 Technique d'étude**III.5.1 L'ensemencement**

La méthode d'ensemencement se déroule comme suit : des milieux LB sont préparés en surfusion à 45°C, puis versés dans des boîtes de Pétri et laissés refroidir. Chaque boîte est ensuiteensemencée en quadrant à l'aide d'une anse de platine, avec une goutte de la solution Mère préalablement préparée. Une fois ensemencées, les boîtes sont placées en incubation aérobie à 37°C pendant 24 heures **(Figure11)**.



L'ensemencement

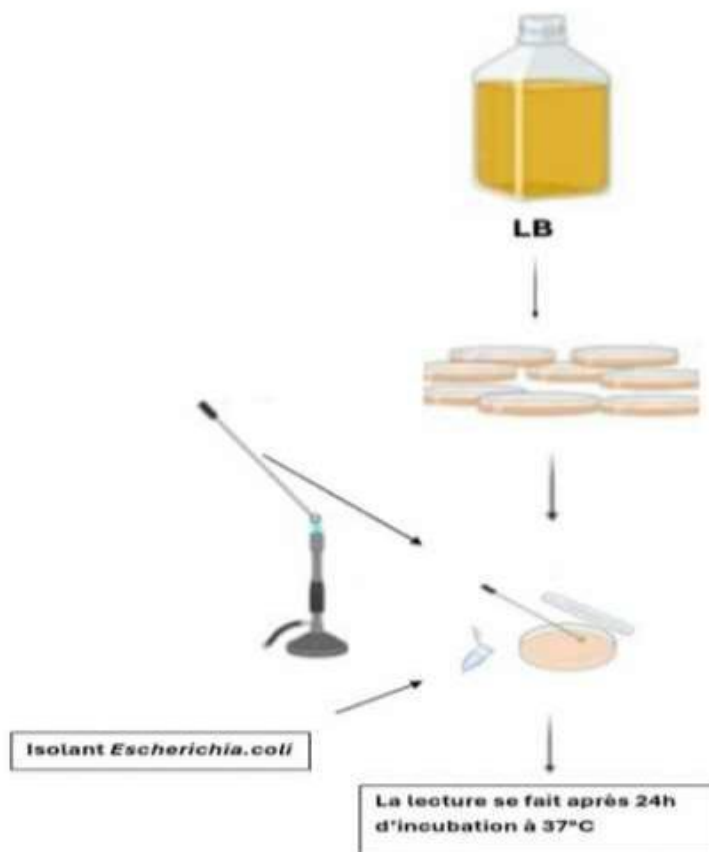


Figure 10 : Schéma l'ensemencement d' *Escherichia coli*.

III. 5.2 Le repiquage :

Le repiquage des colonies est une méthode pratique pour isoler et cultiver sélectivement des micro-organismes en transférant une seule colonie dans un nouveau milieu stérile. Cela permet d'étudier et de caractériser les micro-organismes présents dans un échantillon, ainsi que de les utiliser pour des expériences ultérieures ou des applications biotechnologiques

En conditions stériles, prélevez une seule colonie isolée de la souche *E. coli* à l'aide d'une anse de platine stérilisée et transférez-la dans du bouillon LB stérile. Incubez le bouillon dans un incubateur orbital agité à 37 °C, en le faisant tourner à 160 tr/min pendant 24 heures. (Figure 12)

En fait le même principe avec la souche de *Proteus mirabilis* dans un bouillon LB.

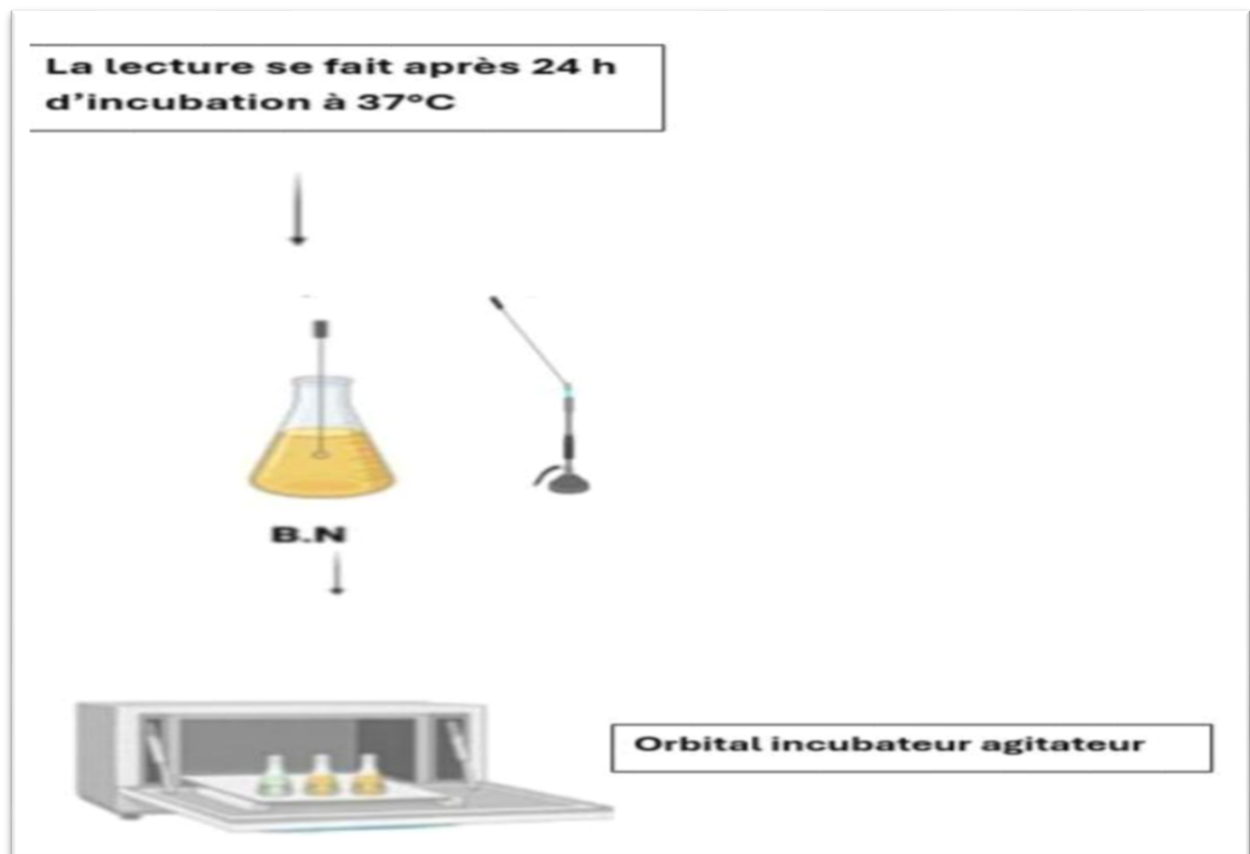


Figure 11: Schéma de repiquage des colonies

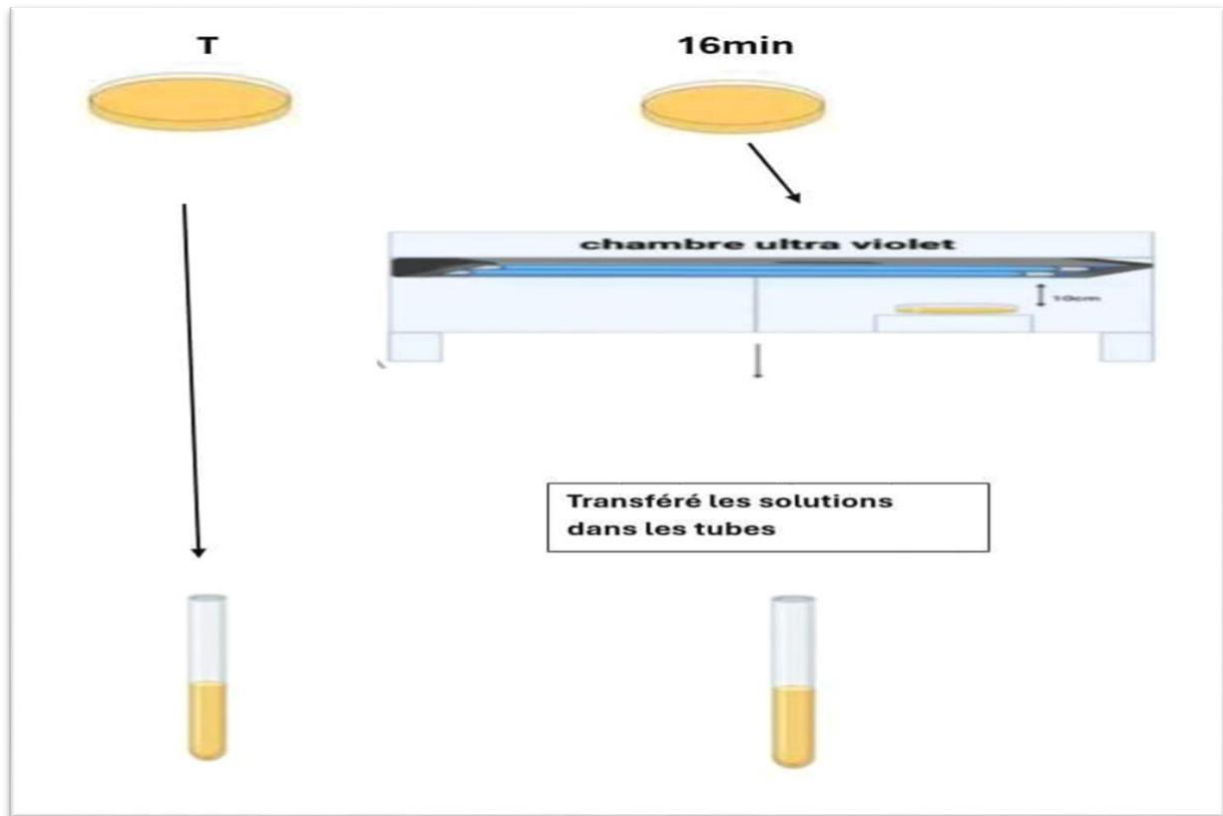


Figure 12: Schéma présente le protocole d'Exposition de suspensions au rayon ultraviolet

III.5.3 Exposition UV :

En général, les agents mutagènes ont la capacité de causer des dommages à l'ADN cellulaire, notamment en perturbant sa réplication. Si les agents mutagènes chimiques ne sont pas disponibles, on utilisera les rayons ultraviolets (UV) pour induire la mutagenèse chez *E. coli* en recourant à des agents mutagènes physiques.

Les rayons ultraviolets, communément appelés UV, sont une forme de rayonnement électromagnétique similaire à la lumière visible, mais avec des longueurs d'onde plus courtes, ce qui les rend invisibles à l'œil humain.

Après avoir mesuré la concentration microbienne dans la suspension d'origine, les échantillons sont répartis dans deux tubes, chacun contenant 10 ml. Ensuite, le contenu de chaque tube est transféré dans une boîte de Pétri et exposé individuellement aux rayons UV pendant une durée spécifiée (de $t=0$ à $t=16$ minutes), avec une distance fixe de 10 cm entre la lampe UV et la boîte. (**Figure 13**)

Les tubes sont recouverts de papier aluminium pour éviter toute exposition à la lumière.

III.5.4 Dilution décimale :

Après l'exposition à l'UV, les dilutions décimales sont préparées, selon le protocole Suivant

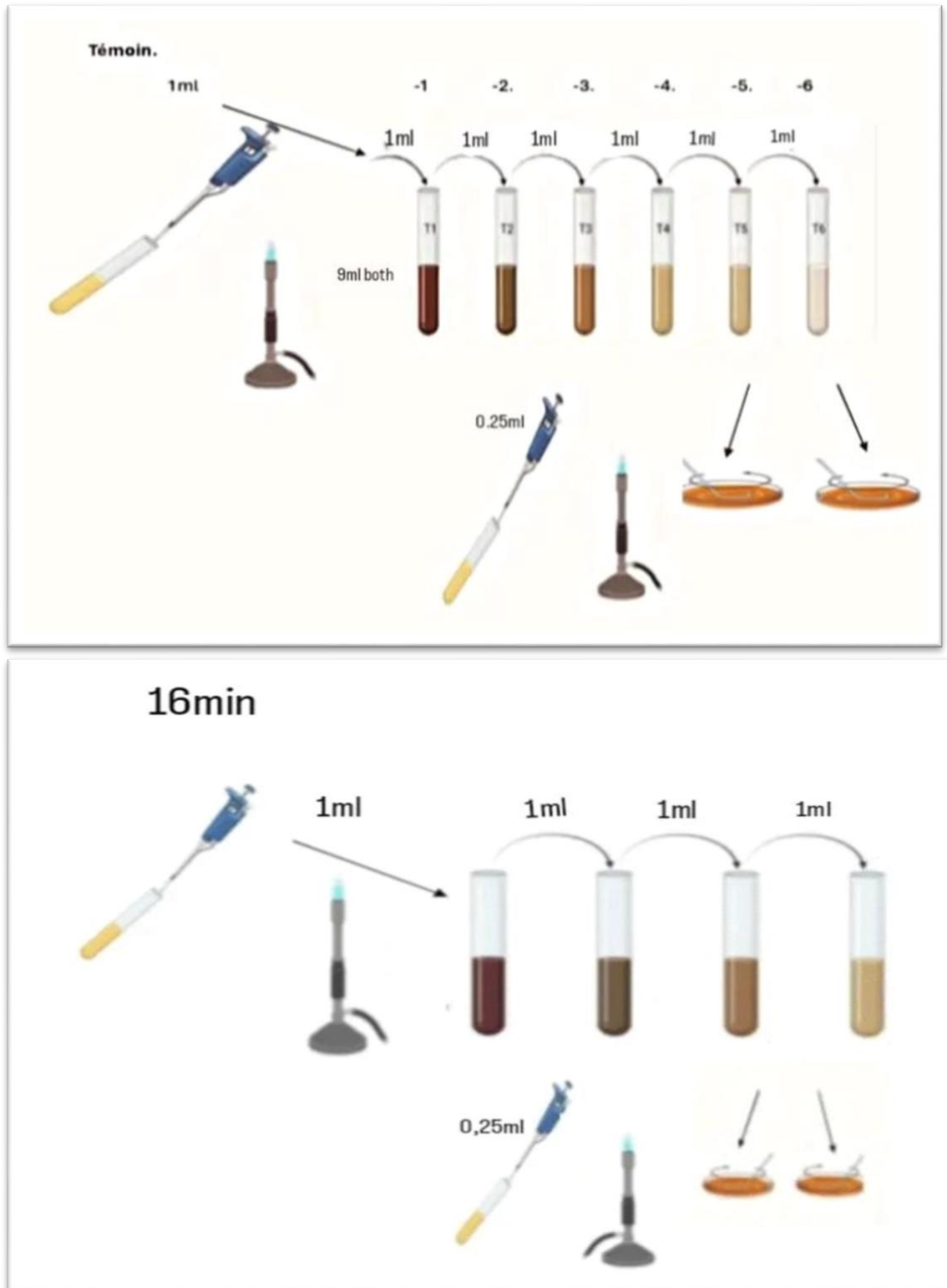


Figure13: Protocole de dilution décimale et étalement.

Les étapes sont effectuées de la même manière pour les deux isolats. Chaque tube contenait 9 ml d'eau distillée stérile.

Ensuite, la suspension bactérienne est diluée, et chaque dilution est étalée (0.25 ml) à la surface d'un milieu LB dans une autre boîte de Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures, Pour Déterminer la viabilité des bactéries. Les colonies sont exprimées en UFC/ml. (Figure 14)



Figure 14: les tubes de dilution d'*Escherichia coli* après l'irradiation UV.

III. 5.5 Antibiogramme

Nous avons testé la sensibilité de la souche *Escherichia coli* à divers antibiotiques en utilisant la méthode standard de l'antibiogramme par diffusion sur gélose LB.

Antibiogramme par disque

Verser le LB fondu uniformément dans deux boîtes de Petri jusqu'à obtenir une épaisseur de 4 mm, laisser refroidir jusqu'à solidification. Ensuite, ajouter 5 gouttes de chaque suspension bactérienne dans les deux boîtes de Petri et étaler uniformément la surface à l'aide d'une pipette râteau. Délicatement, placer trois antibiotiques dans chaque boîte à l'aide d'une pince flambée,

en appuyant légèrement sur chaque disque d'antibiotique pour garantir un contact uniforme avec le milieu. Enfin, incuber à 37 °C pendant 24 heures (**Figure 16**).

Lecture et interprétation :

On mesure le diamètre de la zone d'inhibition de chaque Disque d'antibiotique à l'extérieur de la boîte fermé ; On compare les résultats aux valeurs critiques On classe les bactéries selon trois catégories : sensible, Intermédiaire ou résistant.

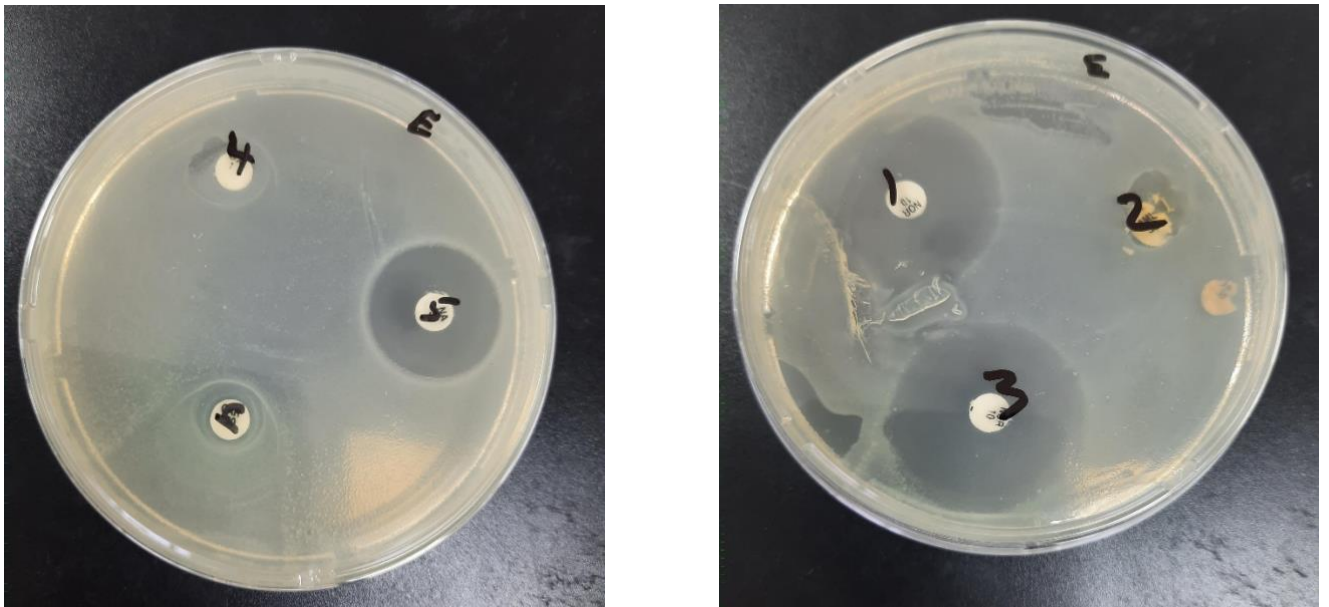


Figure15 : Antibiogramme d' *E. Coli*.

Les antibiotiques testés : 1 :Néomycine 2 :Amoxicilline 3 :Norfloxaciné .
4 :Oxacilline 5 :Acide nalidixique 6 :Carbénicilline.

III.5.6 Dilution de antibiotiques :

Pour étudier l'effet de l'exposition aux rayons ultraviolets sur la sensibilité aux antibiotiques, nous sélectionnerons les antibiotiques auxquels *Escherichia coli* (même famille) est sensible pour les tester.

1^{ère} concentration de antibiotiques :

Pour préparer une série de tubes avec des dilutions d'antibiotique, commencez par remplir chaque tube avec 9 ml d'eau distillée. Ensuite, ajoutez 25 mg d'antibiotique ciprofloxacine (comprimés de Ciprolon) à 9 ml d'eau distillée. Prenez 1 ml de cette solution diluée et ajoutez-la à 150 ml de milieu LB fondu à l'aide d'une micropipette. Refermez les boîtes. Ensuite,

prélevez 0,25 ml de chaque diluant de suspension à l'aide d'une micropipette, inoculez-les sur la gélose avec un étaleur stérile en forme de râteau, puis incubez à 37 °C pendant 24 heures.

Après l'exposition aux UV, on ajoute 40 mg d'antibiotique Gentamicine à 9 ml d'eau distillée à l'aide d'une micropipette. Ensuite, on prélève 1 ml de la solution diluée de gentamicine et on l'ajoute à 150 ml de milieu LB fondu à l'aide d'une micropipette. Par la suite, dans un rayon de 30 cm autour de la flamme d'un bec bunsen, on prélève 0,25 ml de la suspension irradiée aux UV à l'aide d'une micropipette. Ce prélèvement est inoculé sur la gélose avec un étaleur stérile en forme de râteaux, puis incubé à 37 °C pendant 24 heures.

2eme concentration d'antibiotiques

Après dilution de la gentamicine, prélevez 900 microlitres et ajoutez-les à du milieu LB fondu.ensemencez les boîtes, puis prélevez 0,25 ml de la suspension irradiée aux UV et étalez-la sur de la gélose à l'aide d'un étaleur stérile en forme de râteaux. Enfin, incubez à 37 °C pendant 24 heures. Ce même processus s'applique également à la ciprofloxacine

Réaliser une dilution en série de la ciprofloxacine et Gentamicine selon le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : concentration de l'antibiotique gentamicine après dilution

Numéro des tubes	1	2
Eau distillée stérile (ml)	9	9
Concentration de tubes (mg/ml)	4	0.4
Concentration finale en micro g/ml	26	3,0

Tableau 5 : concentration d'antibiotique ciprofloxacine après Dilution.

Numéro des tubes	1	2
Eau distillée stérile (ml)	9	9
Concentration de tubes (mg/ml)	2,5	0,25
Concentration finale en micro g/ml	16	2,0

III. 5.7 Sélection des mutants :

Après avoir été exposée aux UV, la suspension bactérienne de *Proteus mirabilis* est diluée, puis chaque dilution est étalée à la surface d'un milieu LB dans une autre boîte de Pétri, avec une quantité de 0,25 ml. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures. Les colonies sont prélevées et utilisées pour former un master pliate dans une nouvelle boîte de LB, qui est ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures.

En milieu sélectif tel que le Milieu Minimum (MM) dépourvu de nutriments, la méthode des répliques ou Empreintes de Leberberg est utilisée. Cette technique consiste à transférer une empreinte depuis une boîte de Pétri contenant des colonies cultivées dans du LB vers une nouvelle gélose (MM), ainsi que vers du LB contenant des antibiotiques. En comparant les deux boîtes, les clones mutants peuvent être aisément identifiés sur le MM, car seules les colonies mutantes y poussent.

IV. Résultats

IV.1 Aspect macroscopique

Dans le milieu Luria Bertani (LB), les colonies d'*Escherichia coli* ne présentent aucune coloration visible, tandis que dans le milieu minimum, les colonies de *Proteus mirabilis* se manifestent sous une teinte blanche.



Figure 16 : Aspect macroscopique des colonies *Proteus mirabilis* sur gélose MM.

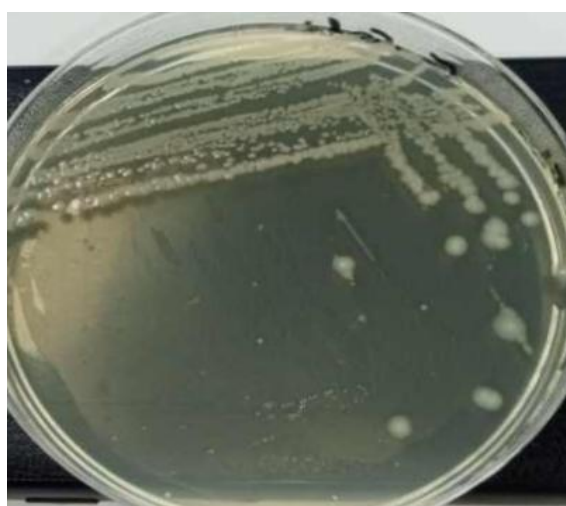


Figure 17 : Aspect macroscopique des colonies *Escherichia coli* sur gélose LB

IV2 L'effet de l'UV sur la survie des isolats

IV 2.1 Résultats de la mutagénèse :

Après l'exposition des souches aux UV et après incubation à l'étuve pendant 24 heures A 37°C. Les résultats obtenus sont illustrés dans figure 19,20.

Les dilutions ont été réalisées après avoir soumis les souches d'*Escherichia coli* et de *Proteus mirabilis* à des durées d'exposition aux rayonnements ultraviolets (0 et 16 minutes). Ensuite, une quantité précise de 0,25 ml pour chaque isolat a été répartie sur un milieu de culture. La quantité exacte de rayonnement reçu par les cellules n'était pas déterminée, faute de dispositif de surveillance UV disponible.



Figure 18 : Croissance bactérienne d'*Escherichia coli* après l'irradiation par UV a
Défèrents déluitions.

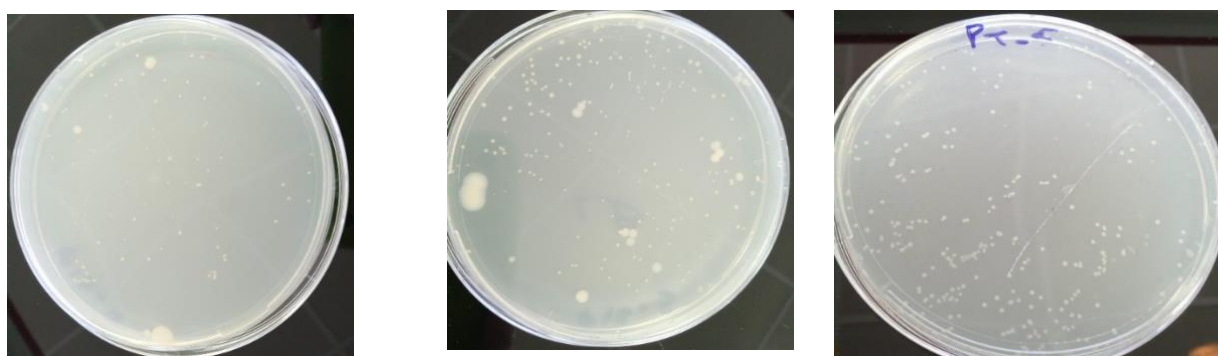


Figure 19 : Croissance bactérienne *Proteus mirabilis* après l'irradiation par UV a
Défèrents déluitions.

Tableau6 : Le nombre de colonies en UFC / ml chez *Escherichia coli* après l'exposition A
l'UV.

Temps	T(0)	16 min	% survie	% mortalité
≠ Colonies	275	742		
Survie (UFC/ml)	$275 \times 10^{+6}$	$742 \times 10^{+3}$		
Pourcentage %	100	0,03	3.0	97.0

Tableau 7 : Le nombre de colonies en UFC / ml chez *Proteus mirabilis* après l'exposition A l'UV.

Temps	T(0)	16 min	% survie	% mortalité
≠ colonies	253	108		
Survive (UFC/ml)	$253 \times 10^{+5}$	$108 \times 10^{+4}$		
Pourcentage %	100	0.04	4.0	96.0

Après comparaison des boîtes irradiées avec la boîte témoin et une incubation de 24 heures, il est clair que la boîte irradiée pendant 16 minutes présente un nombre de colonies réduit par rapport à la dernière. L'exposition aux UV a donc un effet létal sur la survie des bactéries. À mesure que le temps d'exposition augmente, le nombre de colonies diminue. Cela suggère que les souches *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* sont plus sensibles aux UV et que leur survie après irradiation dépend du temps d'exposition aux rayons.

IV.3 L'antibiogramme

IV.3.1 L'antibiogramme par disque

Comme mentionné précédemment, une souche d'*E. Coli* a subi un test d'antibiogramme pour évaluer sa sensibilité à différents antibiotiques (NEO, AMX, NOR, OXA, NAL, CAR). Les résultats sont présents dans le tableau 8 .

Tableau 8 : résultat de test de l'antibiogramme (Sensible S)(Résistance R)

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques	Sensibilité
Bêta lactamine	Amoxicilline	R
	Oxacilline	R
	Carbénicilline	R
Aminosides	Néomycine	S
Quinolones	Nalidixique Acide	S
Flurooquinolone	Norfloxacin	S

Interprétation :

D'après le profil de résistance présenté, des souches d'*Escherichia coli* sont résistantes à l'amoxicilline, à la Carbénicilline et à l'oxacilline. En revanche, elles sont sensibles à la l'acide nalidixique, à la Norfloxacine et à la Néomycine haute charge.

IV 3.3 Méthodes de dilution :

Les dilutions ont été réalisées après une exposition de 16 minutes d'*Escherichia coli* aux rayons UV. Ensuite, 0,25 ml de cette souche ont été étalés sur un milieu contenant différents Antibiotiques à deux concentrations distinctes. Les résultats observés après une incubation de 24 heures indiquent l'impact des rayons UV sur la sensibilité de l'*E. coli*.

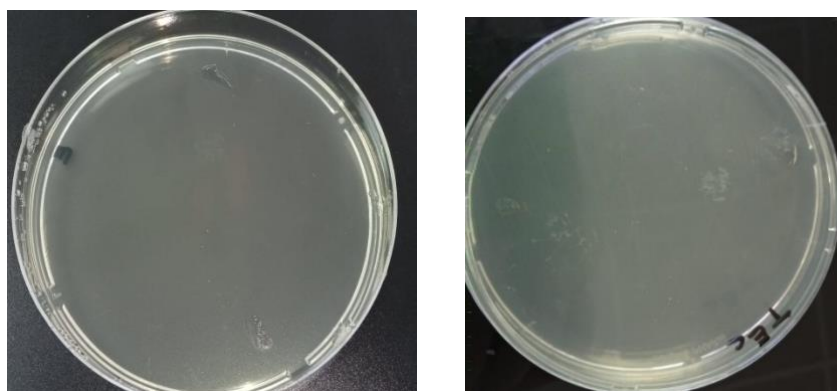


Figure 20: *Escherichia coli* dans milieu LB contenant antibiotiques (témoin)

Dans le 1^{ère} concentration d'antibiotiques

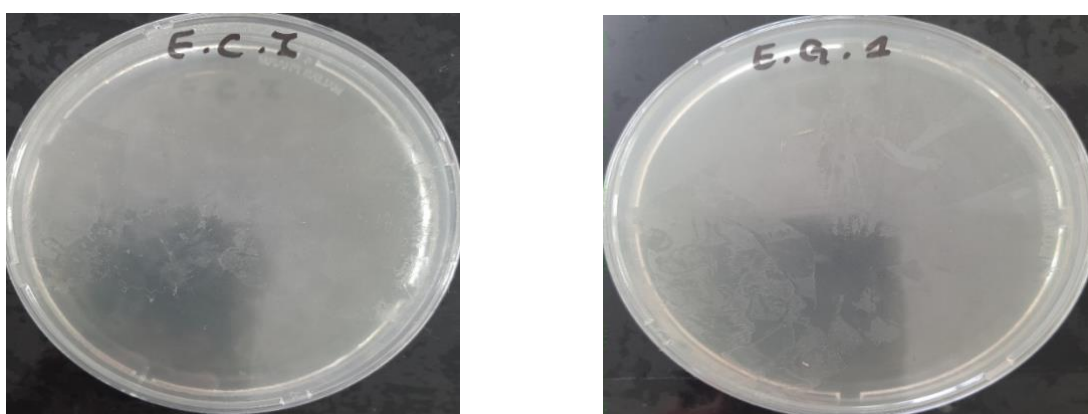


Figure 21: Croissance bactérienne d'*Escherichia coli* après l'irradiation par UV a différents antibiotiques.

EC1 : *E coli* dans gélose LB+ ciprofloxacine .

EG1 : *E coli* dans gélose LB+Gentamicine.

Après l'incubation, il n'y a eu aucune croissance dans le milieu contenant de la ciprofloxacine ou de la gentamicine, ce qui suggère que la souche d'*Escherichia coli* reste sensible à ces antibiotiques (aucune mutation n'a été détectée).

Dans 2eme concentration d'antibiotiques

Après l'incubation, une seule colonie apparaitre dans la boite sur le milieu contenant une concentration létale d'antibiotique ciprofloxacine (mutation).

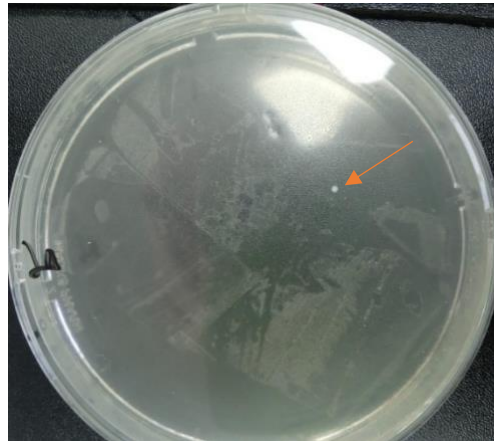


Figure 22 : Croissance bactérienne d'*Escherichia coli* après l'irradiation par UV sur gélose LB contenant ciprofloxacine. Fleche rouge indique une colonie résistante.

Pour confirmer ces résultats, cette colonie est prélevée et ensemencée à la fois dans un milieu LB standard et dans un milieu LB contenant de la ciprofloxacine.

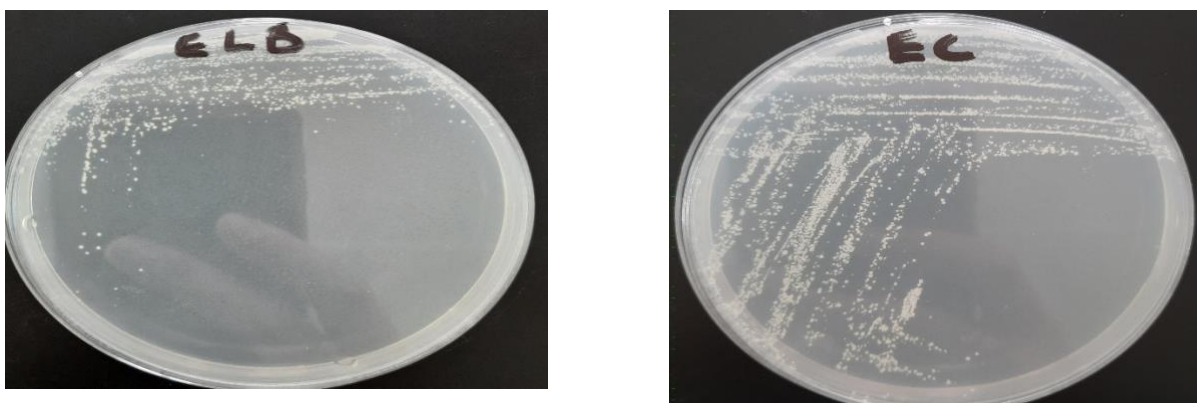


Figure 23: *Escherichia coli* après confirmation.

ELB : *E coli* dans gélose LB après confirmation .

EC : *E coli* dans gélose LB+ciprofloxacine après confirmation.

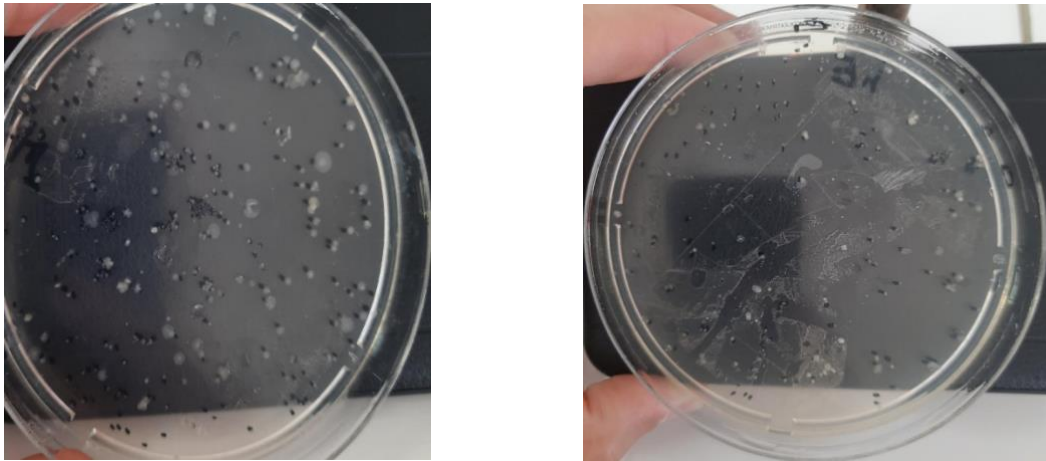


Figure 24 : Croissance bactérienne d'*Escherichia coli* après l'irradiation par UV sur gélose LB contenant Gentamicine.

Après incubation, dans les boîtes contenant de l'antibiotique gentamicine, on observe des colonies mutants présentant un changement de sensibilité à la résistance .

IV 4 Sélection des mutants :

En milieu sélectif, on utilise une méthode de réplique pour transférer une empreinte depuis une boîte de Petri contenant un milieu LB non sélectif où des colonies de *Proteus mirabilis* se sont développées pour former une plaque maîtresse, vers une nouvelle boîte contenant un milieu sélectif (MM) avec ajout d'antibiotiques.

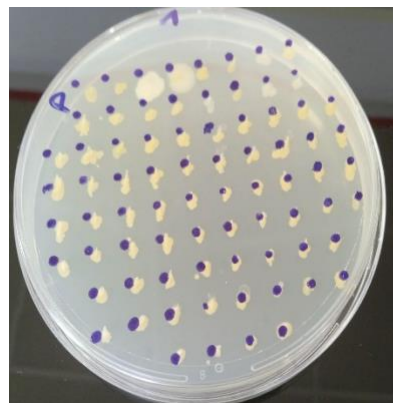


Figure 25 : Master plate de *Proteus mirabilis*

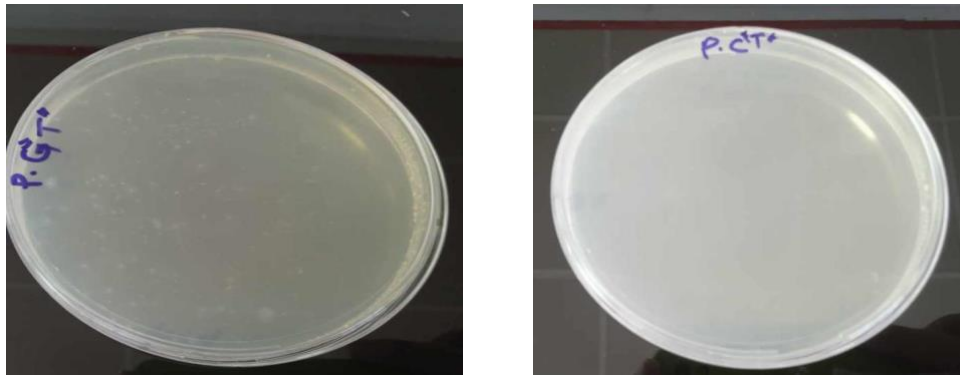


Figure 26 : *Proteus mirabilis* i dans milieu LB contenant antibiotiques (témoin)



Figure 27: Sélection des mutants dans différents milieux

Pmm1 : *Proteuse mirabilis* sur gélose MM après sélection.

pc1 : *Proteuse mirabilis* sur gélose LB+ciprofloxacine après sélection ..

PG1 : *Proteus mirabilis* sur gélose Lb + gentamicine après sélection

Le cercle indique les trois souches mutantes.

IV 4.1 Sélection dans Milieu MM

Les bactéries de *proteuse mirabilis* qui ne peuvent pas pousser sur un milieu minimal seront considérées comme des souches mutantes. Nous avons sélectionné trois souches, UV2, UV10 et UV11 (sélection négative), pour cette étude de mutation.

IV 4.2 Sélection sur Milieu LB contenant les antibiotiques

Il n'y a pas de croissance dans le milieu LB avec gentamicine, car la souche de *Proteus mirabilis* y est résistante en raison d'une mutation. Cependant, les colonies qui se développent sur le milieu LB avec ciprofloxacine seront identifiées comme des souches mutantes, car la souche de *Proteus mirabilis* est sensible à cet antibiotique, ce qui constitue une sélection positive.

Discussion

Dans cette expérience, nous avons observé que l'exposition aux rayons UV a réduit la survie des souches *Escherichia coli* le pourcentage de survie passent de 100% à 97.7% après 16 minutes et *Proteus mirabilis* à la même durée passent 100% à 96% à une distance de 10 cm de la lampe UV. Nous avons également étudié l'effet mutagène du rayonnement UV ainsi que les mécanismes de résistance et de sensibilité aux antibiotiques chez *Escherichia coli*, utilisé comme modèle.

A travers cette étude, nous avons étudié les effets antimicrobiens des ultraviolets (UV) sur deux souches bactériennes qui a été soumises à un traitement par l'UV (16 min) et distances de la lampe été fixé. Les différents résultats confirment la sensibilité de la différente souche testée aux rayonnements UVC, Les UVC (254 nm) sont responsables de l'action antimicrobien. Le pourcentage d'inhibition % qu'elles ont déterminé à partir le nombre d'unité formant colonies UFC/ml. L'observation des résultats nous a permis de conclure que l'effet antimicrobien des UV augment avec l'augmentation de temps de traitement par l'UV. (Belatra, 2023)

Dans une autre étude de (Blatchley et Peel, 2001) qui montre que l'inactivation d'*E. coli* affiche un maximum à 270 nm, avec une réduction de population de 0,43 log par mJ/cm². La sensibilité à la longueur d'onde d'*E. coli* correspond bien aux spectres d'absorption des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Cela confirme que l'absorption des rayons ultraviolets par les dimères de pyrimidine dans l'ADN induit une liaison covalente et inhibe la réplication cellulaire, qui est la principale raison pour laquelle les micro-organismes sont inactivés par le rayonnement ultraviolet. Ce qui confirme que le nombre de colonies a diminué en raison de l'exposition aux UV.

Les rayons ultraviolets peuvent modifier l'ADN des bactéries. Les dimères de pyrimidine, qui sont des liaisons anormales entre des bases pyrimidiques adjacentes (par exemple, Thymine-thymine ou cytosine-cytosine) sur la chaîne d'ADN, peuvent être créés par des photons ultraviolets plus précisément. Ces dimères de pyrimidine déforment la structure de l'ADN

Dans notre expérience sur la résistance et la sensibilité de la bactérie *Escherichia coli* aux antibiotiques, il s'est avéré qu'*Escherichia coli* est sensible aux antibiotiques Gentamicine et Ciprofloxacine.

Dans une autre expérience sur deux souches d'*Escherichia coli*, Une résistante à l'ampicilline (Amp^R) et une autre sensible (Amp^S). La bactérie Amp^R possède un plasmide contenant une enzyme capable d'inactiver l'ampicilline. Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés sur un tapi bactérien à tester. L'antibiotique va être diffusé dans le milieu de culture. La concentration sera élevée au bord du disque et de plus en plus faible à mesure que l'on s'en éloigne. Si la bactérie est sensible, une zone d'inhibition (absence de croissance de la bactérie) sera visible autour du disque. Plus la bactérie est sensible, plus la zone d'inhibition sera grande. En mesurant le diamètre de la zone d'inhibition et en la comparant à des tables de référence il est ainsi possible de savoir si la bactérie est sensible ou résistante à cet antibiotique. (Bioutils,2007).

Conclusion

Les rayons UV est une méthode de traitement récente plus utilisé pour traitement de l'eau potable, les aliments ...etc. Ce projet vise a étudier l'effet des rayons ultraviolets (UV) sur la survie d'*Escherichia coli* et de *Proteus mirabilis*.

Les résultats montrent une diminution significative du nombre de cellules viables après une exposition aux UV pendant 16 min, confirmant l'effet antimicrobien des rayonnements UV. De plus, l'étude révèle que l'efficacité des UV varie selon les souches bactériennes, et que l'exposition aux UV peut également affecter la sensibilité aux antibiotiques, conduisant à des changements dans le profil de résistance bactérienne. La sélection de mutants montre que les souches mutantes ne peuvent pas se développer sur un milieu sélectif.

En conclusion, cette étude souligne l'importance du traitement par UV pour éliminer les bactéries pathogènes.

- **AMF téléthon,(2013)**, Téléthon Une révolution médicale. Tout savoir et comprendre Glossaire Acide nucléiques
- **Alain Vadeboncoeur.2015** .24 Canadiens contaminés par la bactérie E. coli24 Canadiens contaminés par la bactérie E. coli <https://lactualite.com/sante-et-science/24-canadiens-contamines-par-la-bacterie-e-coli/> .
- **Arour F., Belatra Z.,(2023)**, Contribution à l'étude sur l'Effet des rayons ultraviolets sur la croissance de Escherichia coli, Mémoire Master , Université Ziane Achour –Djelfa, P 65
- **Atlas R. M., (2010)**, Handbook of microbiological media. CRC Press.
- **Avery OT., McLeod CM., McCarthy M., (1994)**, Induction of transformation by a Desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III. *Journal of Experimental Medicine*, 79, pp. 137-158.
- **Ayad, A., (2016)**, Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez Escherichia Coli au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien, Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid , Tlemcen, P 174
- **Bailey, R. (2019)**. Bacteria shapes. ThoughtCo.
- **Baraduc, R., Darfeuille-Michaud, A., Forestier, C., Jallat, C., Joly, B., and Livrelly, D., (2000)**, Escherichia coli et autres Escherichia, Shigella. Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA : 1115-1126.
- **Belas, R., (1996)**, *Proteus mirabilis* swarmer cell differentiation and urinary tract infection. *In: Mobley, HL.; Warren, JW., editors. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. ASM Press; Washington, D.C.:* p. 271-298.
- **Bennani M. (2014)**. Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu isolées dans les selles. Projet fin d'étude. Institut Pasteur : Sidi Mohamed ben Abdallah. 31 P.
- **Berche P., (2007)**, L'histoire des microbes, Edition : John Libbey Eurotext Collection : médecine science sélection, Paris, P 308.
- **Bergey, D. H. Sneath, P. H. A. John G. (1986)**, Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2
- **Bidet, P et Bingen, E. (2011)**. Bactériologie Médicale. Elsevier Masson SAS : 2^{ème} édition 331-427 p.
- **Bioutils,(2007)** l'interface de l'Université de Genève pour soutenir l'enseignement des Sciences de la Vie. <https://www.bioutils.ch/protocoles/15-les-antibiotiques>

- **Blatchley,E,Peel,(2001)**. Désinfection by ultraviolet irradiation. In S.S. Block (Ed.), Désinfection, Stérilisation, and Preservation (pp. 823-851). Lippincott Williams & Wilkins.
- **Bruckner,M.Z(1993)**.Gramstaining.CarltonCollège.parlons.science
<https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documentsd'information/introduction-aux-bactéries>
- **Calhoun, C., Wermuth, H.R., Hall, G. A (2021)**. Antibiotics. StatPearls [en ligne], (Consulté le 11/07/2021) .<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535443/>
- **Cea (2017)** L'ADN, et la médecine, génomique, personnalisée.
<https://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-adn-et-medecine-genomique-personnalisee.aspx>
- **Chalmera R. and Aird d. F., (2000)**.,Water borne Escherichia coliO157. *Journal of Applied Microbiology*. 88 : P 124-132.
- **Chellat R., (2021)**. Cours génotoxicologie, Université Frère Mentouri.Constantine 1, 45P (1-6).
- **Clos J. (2012)**., L'immunité chez les animaux et les végétaux. Lavoisier. France. P 72.
- **Courvalin P., Leclercq R., Bingen E., (2006)**. AntibioGramme. ESKA. Paris P 465.
- **Delarras C. ,(2014)**., Pratique en microbiologie de laboratoire. Lavoisier. France. P 725.
- **Delphine D., (2008)**. Recherche et caractérisation de déterminants génétiques permettant L'adaptation d'une souche d'*Escherichia coli* a la mamelle bovine. Thèse de doctorat. Nancy-Université Institutue Nationale Polytechnique de Lorraine .P 251 .
- **Dembel M., (2006)**., Fréquence d'isolement des souches d'*Escherichia coli* au laboratoire de L'HGT de février 2002 à décembre 2004. Thèse de doctorat. Faculté de médecine de pharmacie et d'Odontostomatologie. 76 P.
- **Drzewiecka, D. (2016)** Importance et rôles de *Proteus* spp. Bactéries dans les milieux Naturels. *Ecologie microbienne* [en ligne],72 (4) .
- **Escherich T. (1885)**. Die Darmbacterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr Med*. Vol :3(515, 522). Pp : 547- 54
- **Etine, J., Clauser, E., (2001)**. Biochimie génétique, biologie moléculaire. 7eme Edition, Masson. 271-272..
- **Flaudrois, JP. (2004)**. Bactério Géné /croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médicale DCEM1UFR Médecine Lyon Sud-Laboratoire de biométrie .1-10 p.

- **Fontaine. S, (2003).** Les apports de la biologie moléculaire aux vétérinaires. In : Journées Portes ouvertes de l'Association Régionale de Santé et d'Identification Animales, Paris.
- **Francis Crick, (2004),** Francis Crick: A Personal Memory. Molecular Therapy Vol. 10, No. 4
- **Gazengel J.M., Orecchioni A.M. (2013).** Le préparateur en pharmacie. Lavoisier. France. Page 334.
- **Gérard leblon et l'héritier (2009)** "Mutagenèse et agents mutagènes." *Encyclopædia Universalis*” <https://www.universalis.fr/encyclopedie/mutations/3-mutagenese-et-agents-mutagenes/>
- **Ghada Jebah Nouairia,(2013).** Karolinska Institutet | KI · Doctor of Philosophy, Département of Médecine, Huddinge .
- **Giorgetta,2021 .** Santé femmes <https://sante.journaldesfemmes.fr/>
- **Greatorex, J. S., et Thorne, G. M. (1994).** Humoral immune responses to Shiga-like toxins and Escherichia coli O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patient and Healthy subjects, Jo. Clin. Microbiol. Vol : 32. Pp : 1172- 1178.
- **Griffith A. Gelbart W. Miller J et Lewontin R. (2001).** Analyse Génétique Moderne. De Boeck, Paris, France, pp329. <https://vitrinelinguistique.oqlf.gouv.qc.ca/fiche-gdt/fiche/8875112/mutation-non-sens>.
- **Hamilton, L, Kamm,M,A.,et al. (2018).** *Proteus* spp as putative gastro intestinal pathogens. Clinical microbiologie reviews. [En ligne].31(3). <https://scholar.google.fr/scholar?q=related:yuWih8xJVx4J:scholar.google.com>
- **Hanes D., (2003).** Nontyphoid Salmonella. In : Miliotis N., Bier J. (Eds.), International Handbook of Foodborne Pathogens (pp. 137-149). Marcel Dekker :New York.
- **Haubruge E. (2008).** Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux Antibiotiques http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_12956/antibiotiques-contre-bacteries?part=3
- **Hickey ; H. L Fletcher (2000).** L'essentiel en génétique. Port Royal Lievers. Berti Editions p : 101-115.
- **Holt J. (1986)** Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore MD, Vol. I &II.
- **Hygis N. (1998).** Hygiène Hospitalière. Presses universitaires. Lion. P 103-104.
- **Janda J, Abbot S. (2006)** The genus *Proteus*, in 2nd editor, the Enterobacteriaceae, Washington, DC : ASM Press.

- **Kamoun.P, Lavoine A., Verneuil H et al. (2003).**L'Editions Flammarion Printed in France.
- **Kaper, J., & Nataro, J. P. (2004).** Pathogenic Escherichai coli. Nat Rev Microbiol , 2 (2), 123-140.La, C. E. L'antibiogramme.
- **Laskin, A. Et Lechevalier, H. (1994).** Handbook of microbiology. CRC Press. Ohio. Vol : 1. Pp : 1- 15.
- **Laubya A., Marneq G.,(2008),** Les mutations, lycée de l'Hautil (académie de Versailles).
- **Leulmi,Z.(2015).** Les Proteus incriminés dans les infections communautaires et hospitalières : étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques. Thèse de doctorat, Université de Constantine 227p.
- **Liu, D., (2010),** Molecular Detection: Principles and Methods, *In: Molecular Detection of Foodborne Pathogens*, 1st Edition Boca Raton, CRC Press, P 1-22.
- **LOZNIIEWSKI A., RABAUD C., Nancy. (Juillet 2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques.Infections associées aux soins. CCLIN Sud-Est..1 :1-4
- **Lucas R.M. et coll. (2019).** Santé humaine en relation avec l'exposition au rayonnement ultraviolet solaire sous l'évolution de l'ozone stratosphérique et du climat. Sciences photochimiques et photo biologiques 18(3) :641-680 <https://doi.org/10.1039/C8PP90060D>
- **Mainil J., Van Bost S.,(2004),** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : IV) Souches nécrotoxigènes *Ann. Méd. Vét.*, P 121-132.
- **Mendaci A, Mihoubi, (2015).** S. Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries Uropathogènes (*Escherichia coli, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae*. Microbiologie vu Générale et biologies Moléculaire des microorganismes. Université de Constantine, , 88p.
- **Mort M., et al., (2008).** A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. Human Mutation, 29(8), 1037–1047.
- **Muylaert, A., Mainil, J.G (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les Mécanismes et leur « contagiosité ». Ann. Méd. Vét, 156.110
- **Nauciel C., Vildé J. L., (2005).** « *Escherichia coli* ». *In Bactériologie médicale*. 2^{ème} édition, Masson, Paris. Pp 122-125.

- **Nicklin, J ; K. Graeme-Cook T. Paget R.** Killington,2002 : L'essentiel en Microbiologie. Port Royal livres. Berti Editions p : 113-121
- **Pearson M.(2008,)** « Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of Both adherence and motility. J Bacteriol» 2008, Vol 190 n°11, pp 3- 4027.
- **Rao, A. S., (2006),** Bacterial genetics, Genetics Microrao,
<https://www.microrao.com/micronotes/genetics.pdf>
- **Rich, M.,(2022),** Rayonnement ultraviolet – Attributs et avantages, Digi Ke
<https://www.digikey.ca/fr/articles/ultraviolet-radiation-attributes-and-benefits>.
- **Schultz,E.(2018).**Diffusion d'îlots génomiques et multi résistance aux ATB chez *Proteus Mirabilis*. Thèse de doctorat : infectiologie et vaccinologie. Lyon : université François Rabelaisdetours,170p
- **Sedrati A. (2014).** Étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes à l'origine des Infections infantiles à L'EPH d'Ouargla. Mémoire. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 44 P.
- **Smaoui S. (2010),** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, Thèse de doctorat, Génie de procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse, France, P 207.
- **Soumaila G.A. (2012),** Caractérisation phénotypique et génétique des *Escherichia coli* Isolés des cas de colibacillose aviaires au Sénégal. Thèse de doctorat. Université cheikh anta Diop de Dakar. P 79 .
- **Stora D. (2013).** Pharmacologie et thérapeutique 2^e édition. Lamarre. France. P 90- 91.
- **Sylvie C., (2009) ,** Art : La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important!
- **Vaish R., Pradeep M., Setty C. And Kandi V.(2016).**evaluation of virulence factors and antibiotic sensitivity pattern of *escherichia coli* isolated from extra intestinal infections. *cureus*. 8(5) : p 604.
- **véronique f. (2003).** la résistance bactérienne aux antibiotiques. [en ligne]. classeur.pistes.org/chantier/theme/292/resistance_document_d_information.doc. (consulté le 22-03-2017).
- **Vidic J., Manzano M., Chang C-M. And Jaffrezic- Renault N. 2017** advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Vet Research* 48 :11.
- **Watson J., Crick F., (1953).** Molecular Structure of Nucleic Acids : A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737–738.

- **Winter, P C G. I. Hickey; H. L Fletcher (2000):** L'essentiel en génétique. Port Royal Livers. BERTI Editions p : 101-115.

Les annexes

Annexe 1 :

Composition de milieux minimum :

Ingrédients Pour 1000ml

Glucose 10 g

Sulfate d'ammonium 1 g

Phosphate dipotassique 5 g

Phosphate monopotassique 2 g

Citrate de sodium 0,5 g

Sulfate de magnésium 0,1 g

Agar 15 g

Eau distillée Jusqu'à 1000 ml

Le pH du milieu minimal est d'environ $7,0 \pm 0,2$ à 25°C.

Annexe 2 : Composition des milieux Lb

Milieu Luria-Bertani (LB)

Peptone 10g

Extrait de levure 5g

NaCl 10g

Agar 20g

Eau distillée 1L

PH =7,0 ; Stérilisation à 120°C pendant 25 min.

Annexe 3 : Table de lecteur : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et Des CMI chez entérobactéries .

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
Amoxicilline +Ac. clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2
Céfalotine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1
Céfazoline (Infections non compliquées du tractus urinaire)	30µg	≤ 14	—	≥ 15	≥ 32	—	≤ 16
Céftazidime	30µg	≤ 17	18 – 20	≥ 21	≥ 16	8	≤ 4
Aztréonam	30µg	≤ 17	18 – 20	≥ 21	≥ 16	8	≤ 4
Imipénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1
Ertapénème	10µg	≤ 18	19 - 21	≥ 22	≥ 2	1	≤ 0,5
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	—	≤ 16
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Colistine**	CMI	-----	-----	-----	>2	-----	≤2
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1.25/ 23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	-----	≤ 2/38

Annexe 4 : l'appareil d'UV

Longueur d'onde de UV :254

