



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

Etude comparative entre l'effet de deux agents mutagènes
physiques chez *Escherichia coli*

Présenté et soutenu par : -Djaaleb Nesrine
-Aidouci Saliha

Le : 16 /06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Gharzouli R (Maitre de conférences classe B - UFM Constantine).

Rapporteur : Saoudi M (maîtresses assistantes classe A - UFM Constantine).

Examineurs : Bechkri S (Maître assistante classe A - UFM Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015

REMERCIEMENT

Merci à

Dieu

Le tout puissant qui m'a doté

de volonté

&

De patience pour ce travail

REMERCIEMENT

Nous tiendrons tout d'abord à remercier Mme Saoudi M., maître assistante classe A à l'université des Frères Mentouri Constantine pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude.

Mme Gharzouli R, Maître de conférence classe B à l'université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de présider le jury.

Mme Bechkri S, Maître assistante classe A à l'université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir acceptée d'examiner ce travail.

Nous aimerons remercier tous le personnel du laboratoire de microbiologie pour m'avoir facilité l'accès, ainsi pour son aide de près ou de loin, pour leurs conseils, leur aide et disponibilité par leur expérience.

Dédicaces

Je 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

Tes 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 ma très chère sœur

Fadila et son époux Nabil et les anges : Racha, Rami et Idriss : la lumière de notre maison.

A mon cher frère Bilale

Que Dieu vous préserve.

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 : Saliha, Amira, Choubeilla, Souha, Imen et en particulier la seconde sœur qui ne sont pas être dérivé maman Meriem Z et à toute mes amies qui sont proches de mon cœur.

NESRINE DJAALEB

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma mère :

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer
L'immense amour que je te porte. C'est grâce à tes
encouragements que 'ai pu franchir les obstacles de la
vie. J'espère que tu es fière de moi en ce jour de
consécration.

A mon tendre marie Mouloud qui est toujours tout près de
moi, pour me soutenu et m'encouragé.

A mes sœurs, Zahra, Karima et Aridje

Fatima et son époux Ameer et l'ange : Ritadje

merci pour vos encouragements, je vous

souhaite de réussir brillamment dans

vos études ainsi que vie privée.

A mes frères Saleh et Amar

A mes très chères amies Nesrine, Meriem.B, Meriem.M, Yasmine,

Roumaissa, Awatef, Narimane, Rayan, Hadjer.

Tous mes camarades de promotion

A tous les personnes qui ont été toujours près de moi,

Merci pour vos nombreux encouragements et vos conseils.

SALIHA AIDOUCI

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Partie 1 : Recherche bibliographique.....	2
I-Généralité sur les <i>Entérobactériaceae</i>	3
II-Habitat et pouvoir pathogène	4
III-Les caractères bactériologiques	4
III-1Les caractères morphologiques	4
III-2Les caractères cultureux.....	4
III-3Les caractères biochimiques	5
III-4 Caractères antigéniques	5
III-4-1Les antigènes somatiques O	5
III-4-2Les antigènes flagellaires H	5
III-4-3Les antigènes de surface ou d'enveloppe K.....	5
III-4-4 L'antigène Kunitz	6
VI-Classification des entérobactéries	6
V- <i>Escherichia coli</i>	8
V-1-Historique.....	8
V-2-Morphologie.....	8
V-3-Différents pathotypes d' <i>E.coli</i>	9
VI-Besoins nutritionnels	11
VII-Définition d'une mutation	11
VII-Les différents types de mutation	11
VII-Les conséquences de mutation	13
Partie 2 : partie expérimentale	14
I-Matériel biologique.....	15
II-Induction des mutants par un agent mutagène physique	15
1. Exposition aux UV	15
2. Choc thermique	16
3. Sélection des mutants	16

III-Etude microscopique	17
✓ La coloration de GRAM.....	17
VI-Identification des souches bactériennes.....	17
✓ Les différents types de milieux	17
• La gélose nutritive.....	17
• EMB.....	18
V- la courbe de survie.....	18
VI-Métabolisme bactérienne.....	18
1. Source de carbone.....	18
✓ Milieu Manitele-Mobilité.....	18
✓ Milieu Citrate de Simmons.....	19
✓ Milieu Triple-Sugar-Iron.....	19
✓ Milieu de Clark et Lubs test du RM et VP.....	19
2. Source d'azote	20
3.Recherche de l'enzyme	21
✓ Milieu Urée-indole.....	21
VII-Activité antibiogramme.....	21
Partie 3 : Résultats et duscusion.....	23
I-Aspect macroscopique.....	24
II-Détection des mutants	24
II-1-Induction des mutants par les UV.....	24
II-1-1 Courbe de survie.....	24
II-1-2-La sélection des mutants.....	25
II-2-Choc thermique.....	26
II-2-2-Détection des mutants.....	26
III-Aspect microscopique.....	26
✓ Coloration de GRAM.....	26
IV-Identification biochimique.....	27

IV-1 Attaque glucidique.....	27
V-L'antibiogramme.....	32
Conclusion.....	34
Références bibliographiques.....	36
Annexe	

Liste de tableau

Tableau 1 : Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquents en clinique humaine (Pilet C, et Al, 1979).....	7
Tableau 2 : Caractéristique cliniques, pathologique et épidémiologique des causées par les principaux pathotypes intestinaux et extra-intestinaux humains de l'espèce <i>E.coli</i> Robins-Browne et Hartland, 2002.....	10
Tableau 3 : tableau présentant le GRAM et la forme de chaque souche.....	26
Tableau 4 : Tableau présente les caractères biochimiques des souches d' <i>E.coli</i>	31
Tableau 5 : Tableau présente les résultats de test de l'antibiogramme.....	32

Liste de figure

Figure 1 : observation microscopique de la morphologie des entérobactéries (Gx1000).....	3
Figure 2 : observation microscopique entérobactéries mobile par flagelle péritriche (Gx1000).....	3
Figure 3 : <i>Escherichia coli</i> observés au microscope électronique (Gx10000) (Goubau et Pellegrims, 2000).....	8
Figure 4: Mutation de décalage du cadre de lecture et pseudoréversion(Kamoun P et Al, 2003).....	12
Figure 5 : hotte à flux laminaire.....	15
Figure 6 : tampon de velours.....	16
Figure 7 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu GN(S S).....	24
Figure 8 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu EMB(S S).....	24
Figure 9: Courbe de survie de la souche <i>E.coli</i>	25
Figure 10: Souche sauvage exposée aux UV.....	25
Figure 11 : <i>E.coli</i> issue après un choc thermique	26
Figure 12 : Aspect microscopique des souches.....	27
Figure 13 : (A) L'aspect de milieu mannitol-mobilité avec les souches mutantes d' <i>E.coli</i> (B) tube non ensemencé.....	28
Figure 14 : (A) UV4 citrate de Simmons+ (B) tube non ensemencé.....	28
Figure 15 : (A) souches UV1 H ₂ S+ (B) tube non ensemencé.....	29
Figure 16 : (A) Souche VP+ (B) milieu Clarck et Lubs.....	29
Figure 17 : Bactérie RM-	30
Figure 18 : (A) Bactérie décarboxylase (+) (B) Bactérie décarboxylase (-).....	30
Figure 19 : (A) : test d'uréase + et d'indole +. (B) : tube non ensemencé	31
Figure 20: présentée une souche sensible et résistante aux ATB.....	32

Résumé

Une mutation est un évènement fortuit qui se traduit par le changement d'un caractère héréditaire. Ce phénomène est assez rare et considéré comme des erreurs du processus d'autoreproduction conforme du matériel génétique.

Dans la présente étude, au défaut de la non disponibilité des agents mutagènes chimiques, l'induction des mutants chez *E.coli* est réalisée par l'emploi d'agents mutagène physiques en l'occurrence les ultra-violet (UV) et le choc thermique.

Après avoir détectés les mutants, toutes les souches y compris la souche sauvage sont identifiées phénotypiquement (galerie biochimique, coloration de GRAM, l'établissement de l'activité antibactérienne).

Les résultats obtenus ont montré que les caractères de biosynthèse des acides aminés ou de dégradation des sucres n'ont pas été détectés ainsi l'activité uréasique .

Alors que le GRAM été changé aussi la forme de la bactérie, on note aussi que l'activité antigénique flagellaire a été également déléetée. Ceci confirme la nature même des mutations, celle d'être induite.

Abstract

A change is a unforeseeable occurrence which results in the change of a hereditary feature. This phenomenon rather rare and was regarded as errors of the process of autoreproduction in conformity of the genetic material.

In the present study, at the defect of nonthe availability of the physical mutagen agents, the induction of the mutants at E.coli is carried out by the use of physical mutagen agents in fact the ultraviolet ray (UV) and the thermal shock.

After having detected the mutants, all the stocks including the wild stock are identified phénotypiquement (biochemical gallery, coloring of gram, establishment of the antibactérienne activity).

The results obtained showed that the characters of biosynthesis of the amino-acids or degradation of sugars were not thus detected the ureasic activity.

Whereas the GRAM as changed the shape of the bacterium, one also notes as the flagellar antigenic activity has t-piece also déléttée. This confirms nature even changes, that to be unforeseeable.

ملخص

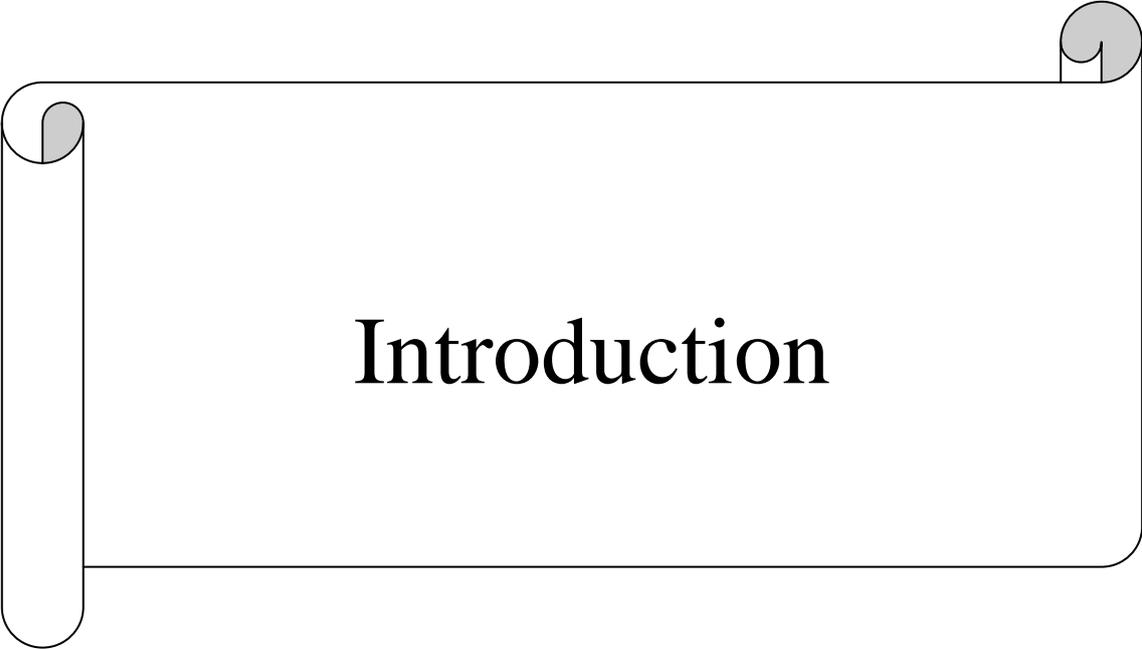
الطفرة هي حدث غير متوقع يؤدي إلى تغيير الطبيعة الوراثية. هذه الظاهرة نادرة جدا تعتبر خطأ في عملية الاستنساخ الذاتي للمادة الوراثية الثابتة.

في هذه الدراسة، ولعدم توفر العوامل المادية الطافرة، تعريض البكتيريا القولونية للطفرة عن طريق استخدام العوامل المادية و في هذه الحالة الأشعة فوق البنفسجية (UV) والصدمة الحرارية.

بعد الكشف عن الطفرات و جميع السلالات منها السلالة البرية المحددة ظاهريا (التعرض للكيمياء الحيوية، تلويين غرام، و نشاط مضاد للجراثيم).

أظهرت النتائج أن التركيب الحيوي للأحماض الأمينية و تفكيك السكريات لم يتم الكشف عن والنشاط اليورياز.

بينما تغيرت GRAM شكل من أشكال البكتيريا، و نلاحظ أيضا أن النشاط السوطي الأنتيجيني قد تم حذفه. هذا يؤكد طبيعة الطفرات، التي لا يمكن التنبؤ بها.



Introduction

Escherichia coli sont des bacilles à GRAM négatif parfois capsulé, mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. *E.coli* est un type de coliforme fécal les bactéries qui sont trouvées dans les intestins d'humains et d'animaux à sang chaud en santé. La plupart d'*E.coli* est inoffensif et sert une fonction utile dans le corp en arrêtant la croissance d'espèce des bactéries nuisible et en faisant des vitamines nécessaire (V K), qui aide à la coagulation sanguin, *E.coli* est l'espèce la plus importante des anaerobies facultatives de l'intestin, la présence d' dans l'eau est témoin d'une contamination fécale qui la rend impropre à la consommation, *E.coli* est pathogène indiscutable pour à l'homme et l'animal.

Cette bactérie généralement sensible aux antibiotiques, a acquis au fil des années des mécanismes de résistance aux antibiotiques.

E.coli vit dans un milieu ou toutes les conditions optimales doivent être réunies pour sa croissance. Si ces conditions changent et plus précisément, choc thermique ; l'ultra violet (UV), la bactérie doit nécessairement s'adapter a son tour pour donner une réponse.

Le choc thermique, UV provoque de multiples effets ; des mutations ; des erreurs d'appariement des bases insertion ou délétion. La conséquence de toute mutation dépend de son effet fonctionnel, qui peut être neutre, conduire a l'amélioration d'une fonction (diversité, évolution) ou a l'altération d'une fonction (effet pathogène).

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

➤ La première partie :

Etudes bibliographique qui résumant les principales caractéristiques d'*E.coli* sélectionnées appartenant à la famille des *Entérobactèriaceae*.

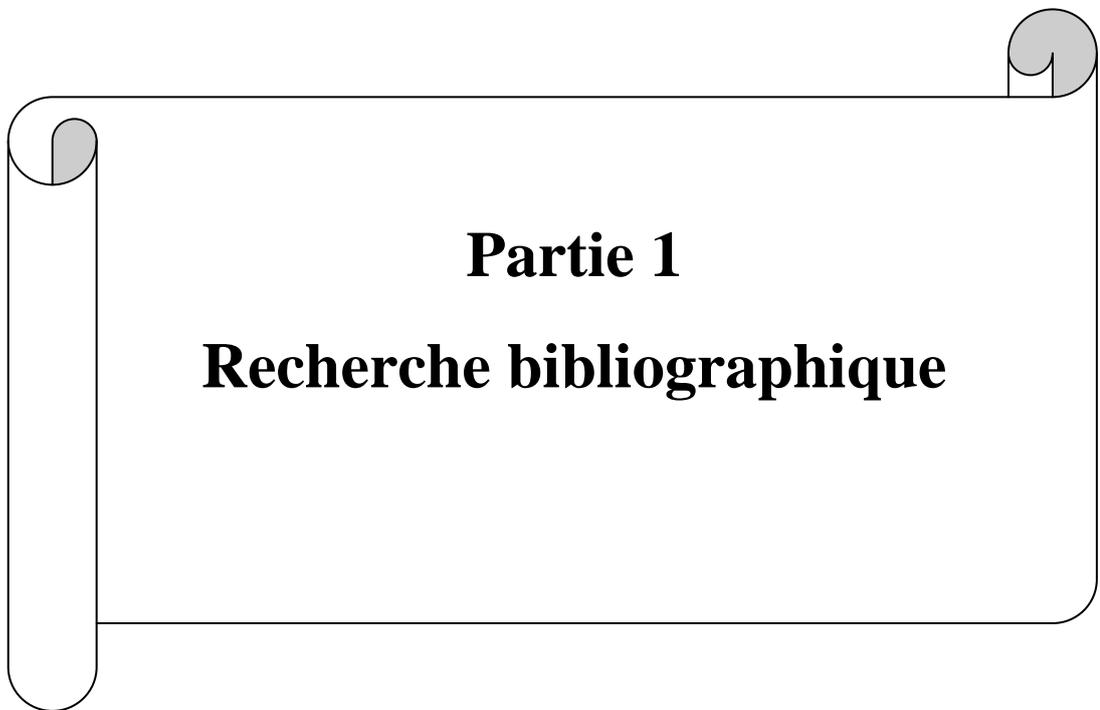
➤ La deuxième partie :

Le travail expérimentale elle est consacrée à :

Préparation de souche sauvage et des souches mutants et identifiée ces souches, préparée la coloration de GRAM et à la fine l'activité antibactérienne des ces souches

➤ La troisième partie

Nous discutons les résultats obtenus lors de cette étude et notre travail est achevé par une conclusion et des perspectives



Recherche bibliographique

I-Généralité sur les *Entérobactériaceae*

La famille des *Entérobactériaceae* est une famille hétérogène, elle comprend de nombreux genres bactériens qui sont rassemblés selon leurs caractères bactériologiques communs. Ce sont des bacilles à GRAM négatif non sporulées, elles sont aérobies-anaérobies facultatives et se développent sur milieu ordinaire (18 à 24 heures à pH neutre à 37°C), Elles sont dépourvues d'oxydase, possédant une catalase et ont la faculté de fermenter le glucose en acides avec ou sans production de gaz, mais aussi de réduire les nitrates(NO_3^-) en nitrites(NO_2^-), Elles ont une mobilité variable en fonction de la présence ou non de flagelles (figure 2) (Avril J.L et Al, 2000).

Les entérobactéries ont une composition caractéristique des bases constituant leur ADN (GC% compris généralement entre 50% et 60%), ce qui permet les différencier des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae* (Murray PR et Al, 1999).

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases).... Etc (Ewing WH, Edwards PR, 1960)

La famille des entérobactéries regroupe de nombreuses espèces qui sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Les entérobactéries sont très répandues. Dans la nature, on les retrouve également dans le sol et dans les eaux en raison de la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécales animales et humaines et des eaux d'égout (Avril JL et al, 2000)

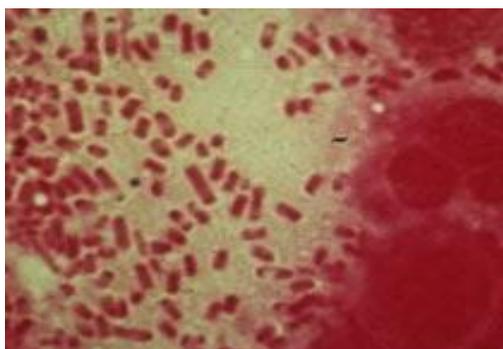


Figure1:observation microscopique de la morphologie des entérobactéries (x 1000)

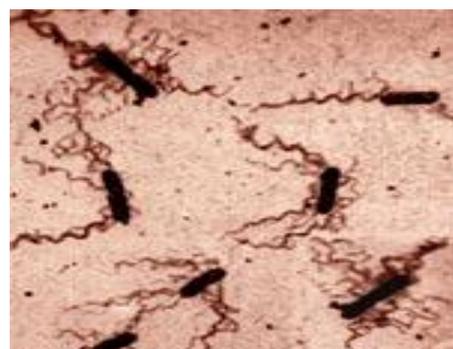


Figure2:observation microscopique des entérobactérie mobile par flagelle péritriche x100

(Anonyme ,2014)

II- Habitat et pouvoir pathogène

Les entérobactéries sont pour la plupart des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Ces bactéries représentent la majorité de la flore intestinale aéro-anaérobie. Chez l'homme, l'entérobactérie prédominante est *Escherichia coli*. Parmi les nombreuses espèces d'entérobactéries, certaines sont trouvées dans l'environnement, d'autres chez les végétaux. Il en est qui ont un pouvoir phytopathogène.

Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certaines (*Shigella*) sont constamment pathogènes. D'autres espèces se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infection chez les malades fragilisés (*Klebsiella*). Leur identification constitue une part importante du travail du laboratoire de bactériologie. (Avril J.L et Al, 2000).

III- Les caractères bactériologiques

III-1 Les caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à GRAM négatif de 2 à 3 μ de long sur 0,6 μ de large, généralement polymorphes.

Certaines espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, par contre les autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*), dont le genre de *Klebsiella* est caractérisé par la présence d'une capsule visible au microscope. La plupart des espèces pathogènes chez l'homme possèdent des pili (fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion (Bakhom I, 2004)

III-2 Les caractères cultureux

Les entérobactéries sont des germes aéro-anaérobies facultatifs poussent facilement sur les milieux ordinaires en 18 heures. La température optimale de croissance est 37°C et avec un pH optimal voisin de 5,5 – 8 et ils sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose

Sur milieux gélosés les colonies d'entérobactéries sont habituellement rondes lisses brillantes à contour régulier et leur diamètre est de 2 à 3 mm après 18 heures d'incubation à 35 – 37°C. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme (Pilet C et Al, 1979)

III-3 Les caractères biochimiques

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude. Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des testes qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres, la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases) la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz (Joly B, Reynaud A, 2003)

III-4 Caractères antigéniques

L'identification des Entérobactériaceae se fait par l'étude des caractères biochimiques. La détermination des sérotypes ne peut être entreprise que pour des souches dont l'identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des erreurs du fait d'agglutinations croisées non spécifiques.

III-4-1 Les antigènes somatiques O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou l'acide.

Les réactions d'agglutination se produisent lentement et sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

III-4-2 Les antigènes flagellaires H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutination se produisent rapidement et constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

III-4-3 Les antigènes de surface ou d'enveloppe K

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B, d'*E.coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. ils sont détruits par une ébullition de 2 heures.

Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

III-4-4 L'antigène Kunin

Cet antigène commun des Entérobactériaceae n'est pratiquement retrouvé que chez certaines familles et a un intérêt taxonomique.

Des antisérums dirigés spécifiquement contre chacun des antigènes bactériens sont préparés en utilisant la méthode de l'absorption spécifique des anticorps *Castelciani*. Des anticorps qui se sont fixés sur l'antigène bactérien correspondant forment des agglutinas. Après centrifugation, il ne reste plus dans le surnageant que des anticorps qui n'ont pas été en contact avec l'antigène. (Avril J.L et AL, 2000).

VI- Classification des entérobactéries

La famille des *Entérobactériaceae* comprend 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à (12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (Pilet C, et Al, 1979).

On peut les classer dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquents en clinique humaine (Pilet C, et Al, 1979).

Recherche bibliographique

Tableau 1 : Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquents en clinique humaine (Pilet C, et Al, 1979).

		Genre	Espèces
GROUPE I	<i>EDWARDSIELLEAE</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>SALMONNELLEAE</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
GROUPE II	<i>ESCHERICHIEAE</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>LEVINEAE</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>KLEBSIELLEAE</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
GROUPE IV	<i>PROTEAE</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>YERSINIEAE</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia</i> <i>Pseudotuberculosis</i>

V-Escherichia coli

V-1-Historique

L'espèce bactérienne *Escherichia coli* a été isolée pour la première fois par Theodor Escherich (1857-1911), connu comme le premier médecin spécialiste des maladies infectieuses de l'enfant. Escherich avait appris les techniques de culture bactérienne avec Wilhelm Frobenius, En premier lieu, Escherich avait réussi à prouver que le méconium était stérile, que la colonisation bactérienne de l'intestin était liée directement à l'environnement du nouveau né, y compris le lait maternel, et que cette colonisation avait lieu pendant les premières 24 heures. Il réussit à isoler 19 souches différentes, entre bacilles et coques, et en suivant les méthodes de culture anaérobie, développées par le biologiste Hans Buchner (1850-1902), Escherich décrit en détail une bactérie appelée *Bacterium lactis aërogenes*, aujourd'hui connue comme *Klebsiella pneumoniae*, et la souche *Bacterium coli commune*, aujourd'hui connue comme *Escherichia coli* (*E. coli*) (Shulman, S.T et Al, 2007).

V-2- Morphologie

Ce sont des bacilles à GRAM négatif parfois capsulé, mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. *E.coli* est un type de coliforme fécal les bactéries qui sont trouvées dans les intestins d'humains et d'animaux. La plupart d'*E.coli* est inoffensif et sert une fonction utile dans le corp en arrêtant la croissance d'espèce des bactéries nuisible et en faisant des vitamines nécessaire, qui aide à la coagulation sanguin (Avril JL et Al,1987), *E.coli* est l'espèce la plus importante des anaerobies facultatives de l'intestin, la présence d'*E.coli* dans l'eau est témoin d'une contamination fécale qui la rend impropre à la consommation, *E.coli* est pathogène indiscutable pour à l'homme et l'animal (James B et Al ,2004), la figure suivante présente la morphologie de la bactérie *E.coli*.



Figure 3 : *Escherichia coli* observees au microscope électronique (Gx10000) (Goubau et Pellegrims, 2000).

V-3-Différents pathotypes d'*E.coli*

Les souches pathogènes d'*E.coli* sont classées en plusieurs pathovars, en fonction des facteurs de virulence acquis par transfert horizontal, des environnements colonisés, des caractéristiques d'invasion et de la pathologie induite.

-Le pathovar EPEC (*E. coli* entéro-pathogènes) est divisé en deux sous-groupes EPEC1 et 2, qui appartiennent au groupe phylogénétique B1 et B2, respectivement.

-Le pathovar EHEC (*E.coli* entéro-hémorragique) est distribué entre les groupes A et B1, mais on trouve aussi des EHEC dans le groupe E, comme le sérovar O157:H7.

-Le pathovar ETEC (*E. coli* entéro-toxigéniques) est distribué entre les groupes A, B1 et C.

-EAEC (*E.coli* entéro-agrégatives) et DAEC (diffusely-adherent *E.coli*) se trouvent dans tout l'arbre phylogénétique sauf les groupes E.

-*Shigella* et les EIEC (*E.coli* entéro-invasives) forment un groupe monophylétique hautement spécialisé.

-Finalement, le pathovar ExPEC (*E.coli* pathogènes extra-intestinaux) est principalement classé dans le groupe B2, avec une petite partie dans le groupe D (Escobar-Paramo, P. et Al. 2004)

Le tableau suivant présente le caractère morphologie ainsi l'effet pathologique d'*E.coli*.

Recherche bibliographique

Tableau 2 : caractéristique cliniques, pathologique et épidémiologique des causées par les principaux pathotypes intestinaux et extra-intestinaux humains de l'espèce *E.coli*, d'après Robins-Browne et Hartland, 2002.

	Pathotypes	Signes cliniques	Signes pathologiques	Epidémiologie
Intestinaux	ETEC	Diarrhée d'eau	Néant	Enfants et touristes des pays en voie de développement
	EIEC	Dysenterie	Inflammation de la muqueuse du côlon	Toutes les personnes sont susceptibles
	EPEC	Gastro-entérite	Lésion de la muqueuse intestinale	Enfants de moins de deux ans dans les pays en voie de développement
	EHEC	Diarrhée avec traces de sang	Lésion de la muqueuse intestinale et nécrose des cellules épithéliales	Enfants et personnes âgées des pays développés
	EAEC	Diarrhée persistante	Inflammation de la muqueuse intestinale	Enfants et touristes des pays en voie de développement
	DAEC	Diarrhée d'eau		Enfants entre deux et cinq ans dans les pays en voie de développement
Extra-intestinaux	UPEC	Infection urinaires	Inflammation de la vessie, du rein ou du bassin	Toutes les personnes sont susceptibles
	MNEC	Méningites	Inflammation des méninges	Nouveaux nés et patients de neurochirurgie

VI-Besoins nutritionnels

La matière sèche d'une bactérie telle qu'*E. Coli* est composée de quelques macro-éléments : C, O, H, N, S, P, constituants des molécules organiques ; K, Ca, Na, Mg et Fe, à l'état de cations dans la cellule et ayant des rôles divers. Certains éléments ne sont retrouvés qu'à l'état de « traces » : Mn, Zn, Co, Ni, Cu, Mo... Ce sont des oligo-éléments (ou micro-éléments), nécessaires au métabolisme microbien, car ils interviennent en tant que cofacteur ou activateur de réactions enzymatiques, *E. coli* est capable de se développer dans un milieu minéral additionné de glucose : elle peut donc synthétiser tous ses constituants carbonés à partir d'une seule source de carbone (le glucose par exemple). Elle dite prototrophe, car elle n'exige pas de facteur de croissance. (Bousseboua H, 2005)

Le métabolisme est usuellement divisé en deux catégories : les processus de dégradation (catabolisme) par exemple pour casser des molécules organiques et produire de l'énergie. Et des processus de synthèse organique (anabolisme) pour biosynthétiser des composés absents dans le milieu de culture comme des acides aminés ou des bases.

Les réactions chimiques sont organisées en chemins (pathway) métabolique dans lesquels un métabolite est transformé en un autre métabolite grâce à une série de réactions chimiques catalysées par une série d'enzymes. Certains chemins métaboliques sont très conservés à travers l'évolution. Tout comme le code génétique ou le dogme ADN-ARN-protéine, la glycolyse et le cycle de Krebs sont présents aussi bien chez *E. coli* que chez l'éléphant. La première espèce dont le métabolisme a été décrit en détail est justement *E. coli*. Cela a été un travail long et fastidieux qui a pris des décennies. Aujourd'hui, on compte plus de 1397 gènes codant pour des enzymes chez cet organisme (Keseler et Al, 2009).

VII-Définition d'une mutation

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, 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, 2000). Il peut s'agir d'un changement d'une seule paire de bases et peut aussi intéresser plusieurs paires de bases. (P.kamoun et Al ,2003).

VII-1-Les différents types de mutation

Une mutation naturelle est un phénomène rare. Il n'affecte qu'une faible fraction de l'ensemble des cellules bactériennes d'une large population (10^{-6} à 10^{-9} par génération). La mutation est mesurable par le taux de mutations qui est la probabilité pour une bactérie de muter

Recherche bibliographique

pendant une unité de temps définit souvent par le temps de génération (Dupont, 2001). La mutation ponctuelle s'agit de la plus simple mutation correspondant à la substitution d'un nucléotide par un autre, mettant en jeu l'altération d'une unique base, ce qui modifie un codon de telle sorte que l'acide aminé soit aussi modifié. Cette mutation est dite faux sens. Alors que, si le nouveau codon code pour un codon stop, la mutation est dite non sens (Winter, 2000).

La délétion s'agit d'enlèvement d'un nucléotide ou d'un segment plus long, l'insertion s'agit d'insérer un nucléotide ou d'un segment plus long, la duplication ou la translocation, concernent des modifications portant sur des chromosomes entiers par modification de leur nombre ou de leurs structures (Daniel P et Al, 2014), la figure 4 fait présenter un exemple de deux types de mutation qui est la délétion et l'insertion.

Séquence sauvage

			fmet	leu	ser	arg	tyr	ser	gln
A	GGG	CAC	<u>AUG</u>	CUG	AGU	AGG	UAU	UCG	CAA



Délétion de U (-1)

			fmet	arg	val	gly	ile	arg	
A	GGG	CAC	<u>AUG</u>	CGA	GUA	GGU	AUU	CGC	AA

Délétion de UG (-2)

			fmet	gln	STOP				
A	GGG	CAC	<u>AUG</u>	CAG	UAG	GUA	UUC	GCA	A

Délétion de UGA (-3)

			fmet	arg	arg	tyr	ser	gln	
A	GGG	CAC	<u>AUG</u>	CGU	AGG	UAU	UCG	CAA	

Délétion de U (-1) et insertion de G (+1)

			fmet	arg	val	Gly	tyr	ser	Gln
A	GGG	CAC	<u>AUG</u>	CGA	GUA	GGG	UAU	UCG	CAA



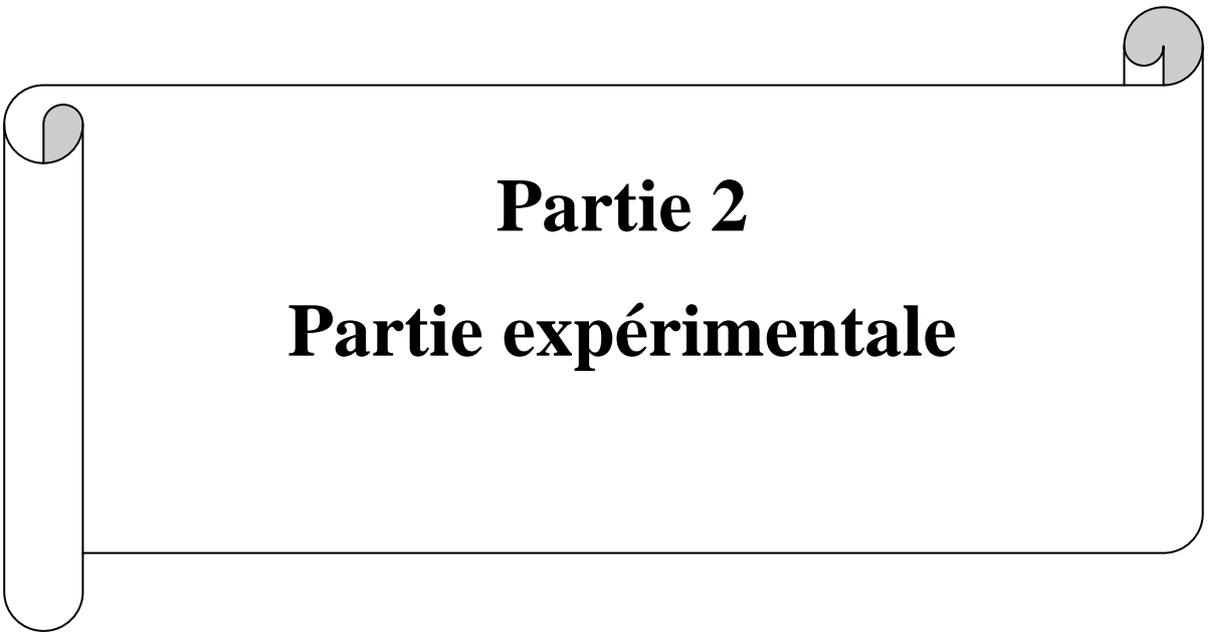
Figure 4: Mutation de décalage du cadre de lecture et pseudoréversion (Kamoun P et Al, 2003).

VII-2-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 délétion d'un petit nombre de paires de bases (produites par des mutagènes qui s'intercalant 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 corrigées 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 à distance et un ou quelques acides aminés sont modifiés, ce qui peut (ou non) affecter la fonction de la protéine considérée. (Kamoun P et Al. 2003).



Partie 2

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1-Matériel biologie

Dans la présente étude, la souche *E.coli* a été fournie par le laboratoire de biotechnologie de département de microbiologie de l'Université de Constantine.

II-Induction des mutants par deux agents mutagènes physiques

Les agents mutagènes sont en générale génotoxiques, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'endommager l'ADN cellulaire et en particulier sa réplication.

A défaut de non disponibilité d'agents mutagènes chimiques, l'induction des bactéries mutagénisées chez *E.coli* sera réalisé par l'emploi d'agents mutagènes physiques en l'occurrence les rayons Ultra Violet (UV) et le choc thermique.

1. Exposition aux UV

Les rayons ultraviolets appelés couramment UV sont un rayonnement électromagnétique de même nature que la lumière visible mais dont les longueurs d'onde sont inférieures et donc non perceptible par l'œil.

La préparation de milieu dilué se fait de la manière suivante :

- A partir d'une culture pure de la bactérie de 18h sur un bouillon nutritif (BN), on effectue une dilution décimale dans l'eau distillée de l'ordre de 10^{-5} .
- à l'aide d'une anse de platine une goutte de la dernière dilution est mise sur boîte de milieu GN puisensemencé.
- les boîtes soumises à différentes durée d'exposition au UV (10sec ; 20sec ; 30sec ; 40sec)
- couvrir les boîtes par papier aluminium pour éviter la réparation par la lumière blanc.
- Mettre les boîtes à incuber à 37°C pendant 18h.



Figure 5 : hotte à flux laminaire

2. Choc thermique

La température : c'est un agent mutagène majeur dont l'action résulte de l'agitation thermique des molécules qui provoque de multiples effets. Parmi ces derniers, l'apparition des formes tautomère ou la rupture de liaison diverse qui provoquent des erreurs d'appariement des bases.

-la technique consiste à mettre le tube de BN contenant la souche dans le congélateur à 0°C pendant 4h et provoquer un choc thermique en plaçant le tube dans l'incubateur à 37 °C pendant 18h.

3. Sélection des mutants

L'isolement ou la détection des mutants s'effectue sur milieu sélectif : Milieu Minimum (MM) qui ne contient aucun élément nutritionnel en appliquant la technique des répliques ou empreintes de Leberberg, à l'aide d'un tampon de velours stérile, une empreinte à partir d'une GN sur laquelle se sont développées des colonies et à reporter cette empreinte sur une nouvelle gélose (MM) dépourvue du facteur de croissance étudié. Dans ces conditions, les souches sauvages pourront se développer sur cette nouvelle gélose tandis que les mutants nutritionnels ne pousseront pas. par comparaison des deux boîtes gélosées, il est facile de détecter sur ce MM les clones mutants. les colonies mutantes poussant uniquement sur milieu riche sont repérées.



Figure 6: Tampon de velours

III-Etude microscopique

✓ La coloration de GRAM

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de GRAM. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram, un bactériologiste danois. Après coloration, les bactéries GRAM+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries. En outre, la coloration de Gram reste une étape essentielle dans l'analyse médicale pour la détermination des pathogènes. Elle permet de visualiser facilement les bactéries et de donner des indications sur leurs formes et leurs tailles.

La coloration est en 4 étapes principales :

Etape 1 : réalisation d'un frottis qui est séché et fixé au bec benzen.

Etape 2 : Recouvrir toute la lame de Violet de Gentiane. Laisser 1 minute.

-Chasser le violet avec le Lugol. Laisser 1 minute.

-Rincer à l'eau. Egoutter la lame.

Etape 3 : décoloration à l'alcool.

-Recouvrir la lame d'alcool/acétone. Attendre 15 secondes.

-Rincer immédiatement à l'eau.

Etape 4 : recoloration à la fuchsine.

-Mettre 2 gouttes de Fuchsine. Laisser 20 secondes.

-Laver abondamment à l'eau.

-Sécher délicatement la lame dans un papier jetable.

IV-Identification des souches bactériennes

Une caractérisation phénotypique est mise en place afin de détecter les souches mutante de la souche sauvage tout en passant par une galerie biochimique et un test d'antibiogramme.

✓ Les différents types de milieux

Pour l'isolement des Entérobactéries, deux types de milieux sont retenus :

- Les milieux non sélectifs qui permettent la culture des germes non exigeants.

- Les milieux sélectifs qui contiennent des antiseptiques pour inhiber la culture des GRAM+.

- **La gélose nutritive (GN)** : (milieux non sélectif)

Ce milieu a été utilisé comme milieu de conservation des souches isolées.

Matériels et méthodes

Composition : C'est un polysaccharide complexe, agent gélifiant.

Préparation de la gélose nutritive déshydratée : Dans un ballon en ver gradué 1L, 28g de milieu déshydraté sont mélangés avec un litre d'eau distillé, sur un mélangeur et le liquide est porté à ébullition pendant 1h et 30mn, à t° maximale. Après que la solution ait refroidi la verser dans de petites bouteilles.

- **EMB**

Le milieu EMB (milieu éosine bleu de méthylène) : Ce milieu est utilisé pour isoler et identifier *Escherichia coli* et *Enterobacter* ainsi les bactéries intestinales à GRAM -.

Lecture :

Escherichia coli: Colonies violet foncé; bombées faiblement confluentes, de 2 à 3 mm de diamètre, à centre noir étendu à plus des 3/4 du diamètre et qui présentent un éclat métallique verdâtre en lumière réfléchie.

V- la courbe de survie

Pour savoir le meilleur temps (entre 1% à 45% de la population vivante), on fait exposée la bactérie aux UV à des temps différents.

VI-Métabolisme bactérienne

Pour l'identification des souches isolées, nous ne disposons que de galeries classiques (conventionnelles), et donc nous avons utilisé des milieux stériles contenus dans des tubes à vis prêts à l'emploi. Ils sont de type gélose inclinée ou liquides, au moment de l'utilisation ils ne doivent présenter aucun virage acide ou dépôt.

Les disques pour la recherche d'enzymes (ONPG) conservé au réfrigérateur dans des étuis étanches contenant un desséchant (gel de silice granulé avec sel de cobalt indicateur). (Euzéby, 2005).

1-Source de carbone

Les milieux d'isolement pour Entérobactéries contiennent le plus souvent un sucre et un indicateur du pH. Les sucres permettent de discriminer les colonies qui les fermentent de celles qui ne le font pas. Les sucres les plus répons utilisés sont : le lactose et le bleu de bromothymol .D'autres milieux peuvent contenir en plus de ces sucres, du saccharose et de la salicine. Certains milieux contiennent du thiosulfate de sodium, lequel en présence du citrate de Fer, permet d'isoler les colonies H₂S+ (coloration en noir des colonies par le sulfure de Fer) (Le Minor, 1993).

✓ **Milieu Mannitol-Mobilité**

Principe : Les bactéries mobiles envahissent le milieu « manitole-mobilité » à partir d'une piqûre centrale d'ensemencement. Le nitrate de potassium contenu dans le milieu empêche la

Matériels et méthodes

formation des bulles de gaz (bactéries gazogènes) par inhibition de l'hydrogène-lyase facilitant ainsi la lecture.

Lecture : Mobilité positive : trouble homogène, formant une spirale autour de la piqûre centrale, qui plus la bactérie est mobile plus elle augmente et s'élargit.

Mobilité négative : la culture bactérienne est limitée à la piqûre centrale.

Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol.

Pas de changement de couleur: l'absence de mannitol. (Vandepitte et al. 1994, Le Minor 1993; Bio Mérieux, 1982, Bourdon, 1980)

✓ Milieu citrate de Simmons

Principe : Il s'agit d'un milieu restreint où la seule source de carbone est le citrate et comme source d'azote un sel d'ammonium, seules les bactéries autotrophes sont capables de croître et d'alcaliniser le milieu contrairement aux bactéries auxotrophes exigeantes en facteurs de croissance.

Lecture : le résultat (+) se manifeste par alcalinisation du milieu qui devient bleu.

En effet, le milieu est tamponné de manière à absorber les ions acides constamment libérés par le métabolisme. L'ion ammonium est dissocié le premier quand un excès d'acide est apparu ; sa combinaison sous forme de phosphate est plus labile que celle du sodium. Le changement de couleur de l'indicateur signale l'apparition de la base libérée

✓ Milieu Triple-Sugar- Iron (TSI)

Principe : le milieu TSI utilisé pour l'identification des entérobactéries dont *E.coli* il permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégradation gazeux), du glucose, lactose, production de d'hydrogène sulfuré H₂S. il ensemebler le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées, Incuber à 37°C pendant 24 heures (capsules desserrées) de manière à favoriser les échanges gazeux.

Lecture :

- si la bactérie fermente le glucose (glucose +) le culot devient jaune.

-si la bactérie utilise le saccharose et le lactose la pente devient jaune.

-si la bactérie produit le H₂S, cette production se traduit par un noircissement dans le milieu du tube.

-s'il a une production une ou plusieurs poches de gaz, la bactérie est productrice soit de CO₂ soit H₂, ou bien les deux.

✓ Milieu de Clark et Lubs test du RM et VP

Principe : En général, les bactéries attaquent les glucides selon une voie métabolique normale appelée la voie d'Embden-Meyerhof et produisent des métabolites acides, (virage au

Matériels et méthodes

rouge du rouge de méthyle) ce pendant certaines bactéries dites Vogesproskauer positives, empreintes une voie particulière pour la fermentations des hexoses donnant des produits de dégradation peu acide par rapport à la voie normale (virage au jaune du rouge de méthyle). (le.Minor, 1993).

- **Test du rouge de méthyle(RM)**

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

Après incubation, le réactif rouge de méthyle est ajouté.

- **Test de recherche de l'acétoïne Voges et proskauer(VP)**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne au cours de la fermentation butylène glycolique : en présence d'une base forte VP11 et d'alpha-naphtol VP1, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.la présence de l'acétoïne se traduit par un virage du milieu a rose rougeâtre.

2-Source d'azote

- ✓ **Milieux Moeller-Falkaw**

Ce milieu fait parti des milieux d'étude du métabolisme protidique.il permet de révéler les décarboxylases liées aux acides aminés étudiés : Lysine Decarboxylase (LDC), Ornithine-décarboxylase (ODC), Arginine Di Hydrolase (ADH).

Ce sont des milieux d'identification très utilisée pour le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles et genres suivants : *Entérobactériaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonas* et genres associés.

-dans un premier temps les bactéries en anaérobiose, fermentent le glucose et donc les milieux s'acidifient (virage du violet au jaune de l'indicateur de pH).

-dans un deuxième temps les bactéries ayant épuisées le glucose peuvent utiliser l'acide aminé présent dans le milieu si elles possèdent les enzymes adéquats.

En anaérobiose et en milieu acide c'est la décarboxylation des acides aminés par les décarboxylases qui est favorisée. L'amine produite ré-alcalinise le milieu ce qui a pour effet de faire viré au violet le milieu.

Lecture : Pour réussir la lecture, il faut toujours s'assurer qu'il s'agit d'une Entérobactérie (fermentation du glucose) et qu'il y a croissance dans les tubes, si non le diagnostic sera orienté vers une bactérie aérobie stricte. (Le Minor ,1993)

-Coloration jaune : absence d'enzymes. ADH-, ODC-, LDC-.

-Coloration violet améthyste : présence d'une décarboxylase. ODC+, LDC+.

-Coloration violette franche pour l'ADH, se lit ADH+.

3-Recherche de l'enzyme

✓ Milieu urée-indole

Principe : C'est un milieu synthétique, utilisé pour la recherche de l'uréase, le tryptophane désaminase (TDA) et la production d'indole. En présence de cette enzyme, l'urée est transformée en carbonate d'ammonium selon la réaction suivante :



Il en résulte une alcalinisation du milieu.

Pour la recherche de l'indole, il suffit de rajouter au milieu urée –indole,ensemencé, étuvé à 37°C et après 24h, quelques goûtes du réactif de Kovacs.

L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne « le tryptophane ». (Vandepitte et *al*, 1994).

Lecture : La présence d'une uréase est indiquée par le virage du rouge de phénol d'un jaune orange à rose ou rouge vif.

Uréase positive entre 1mn et 15mn : *Protéus morgani*, *Yersinia entérocolitica* ;

Uréase positive entre 30mn et 4 heures : *Protéus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri* ;

Uréase positive entre 6 et 24h : *Klebsiella*, *Enterobacter*,

Indole positif : formation d'un anneau rouge en surface. (le.Minor 1993).

VII- Activité antibiogramme

On appelle antibiotique (ATB) toute substance produite par un micro-organisme ou obtenue par synthèse chimique, capable d'inhiber la croissance ou de détruire d'autre micro-organisme.

Les antibiotiques ne sont pas indistinctement actifs sur toutes les espèces bactériennes. Le spectre d'activité d'un antibiotique est une notion théorique qui dépend de la résistance naturelle des souches dites «sauvages ».

PRINCIPE : l'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques.

Par définition de l'organisation mondial de la santé (OMS), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée.

La détermination de cette valeur est peu précise mais elle est consacrée par l'usage et elle bénéficie d'une masse importante d'informations recueillies à son sujet.

Actuellement les deux techniques utilisées sont SFM et NCCLS.

Matériels et méthodes

Le milieu standard utilisé est le Mueller-Hinton (MH) : c'est un milieu reconnu par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et aux sulfamides.

-le milieu Mueller-Hinton est coulé dans une boîte de pétri.

-A partir d'une culture pure de 18h sur BN, à l'aide d'une pipette pasteur prendre la suspension bactérienne et ensemencer sur le milieu.

-Après 15mn de séchage des boîtes, les disques choisis sont posés soit à la pince fine flambée, soit à l'aide d'un distributeur des disques.

-Après incuber les boîtes à 37°C pendant 18h.

-les ATB utilisés : Amoxicilin (AMX), Mezolocilline (MZ), Ceftriaxone (CRO), Doxycycline (DO), Penicilline (P), Acide Pipémique (PI), Lincomycine (L), Sulfamides (S).

Lecture et interprétation

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide du pied à coulisse, à l'extérieur du biote fermé. Comparer les résultats aux valeurs critiques. Classer la bactérie dans une des catégories :

Sensible : les souches **S** sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est acceptable. On doit s'attendre à un effet thérapeutique dans le cas d'un traitement à dose habituelle par voie générale.

Résistante : les souches **R** sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique. On ne peut s'attendre à un effet thérapeutique quel que soit le traitement.

Intermédiaire : les souches **I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Elles forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive.

A decorative graphic of a scroll, oriented horizontally. The scroll is white with a thin black outline. It has rounded ends on the top and bottom. On the left side, the scroll is partially unrolled, showing a grey shadow on the inner curve. On the right side, the scroll is also partially unrolled, showing a grey shadow on the inner curve. The text "Résultats et discussions" is centered on the scroll.

Résultats et discussions

I- Aspect macroscopique

Sur GN, les colonies apparaissent avec des bords rigoureux dont la couleur blanche laiteuse menue d'un aspect sec.

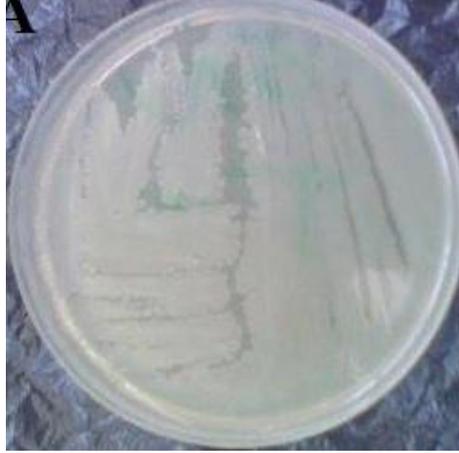


Figure 7 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu GN (S S)

Sur le milieu EMB, la culture des souches relève des colonies violettes foncées bombées présentant un éclat métallique en lumière réfléchie.



Figure 8 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu EMB (S S)

II-Détection des mutants

II-1-induction des mutants par les UV

II-1-1 courbe de survie

Après 24h d'incubation et observation des boîtes, les résultats sont retenus pour tracer une courbe de survie de la bactérie.

Résultats et Discussion

Donc les UV ont un effet létal sur la survie des bactéries ; à chaque qu'on augmente le temps d'exposition, on obtiendra un nombre limité de colonies.

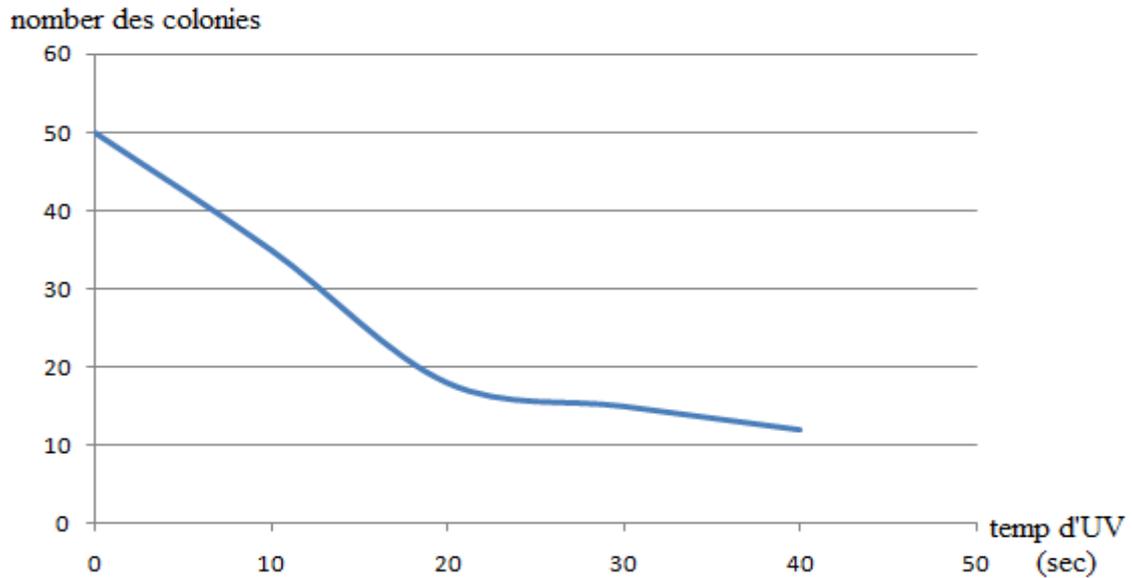


Figure 9 : courbe de survie de la souche *E. coli*

II-1-2-La sélection des mutants

Les bactéries qui perdent la capacité d'être pousser sur un milieu minimum seront prendre en considération comme étant des souches mutantes. Dans notre cas, on a prélevé quatre (04) souches : UV1, UV2, UV3 et UV4.



Figure 10 : Souche sauvage exposée aux UV

II-2-Choc thermique (l'effet de température)

II-2-1-L'observation de la culture

Après avoir provoqué un choc thermique au congélateur pendant 4 h, les bactéries sont mise en culture à l'incubateur jusqu'à 24h. L'apparition de quelque colonie sur GN est prise en considération.



Figure 11 : E.coli issue après un choc thermique

II-2-2-détection des mutants

La sélection des bactéries mutantes se fait avec la même technique qu'avec les mutants induits par les UV.

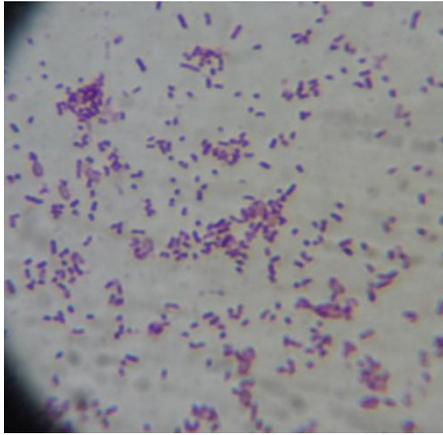
III-Aspect microscopique

✓ coloration de GRAM

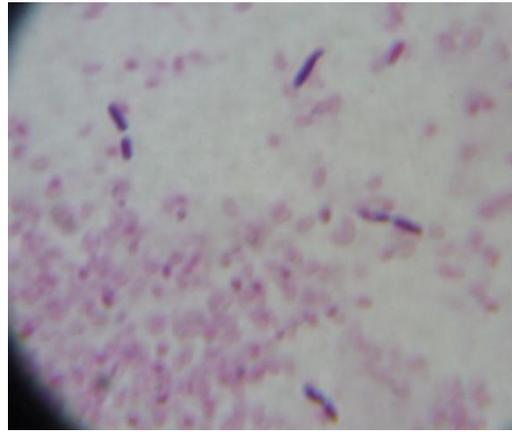
L'observation microscopique après coloration de GRAM monter les différents formes des bactéries sont motionnées dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Tableau présentant le GRAM et la forme de chaque souche

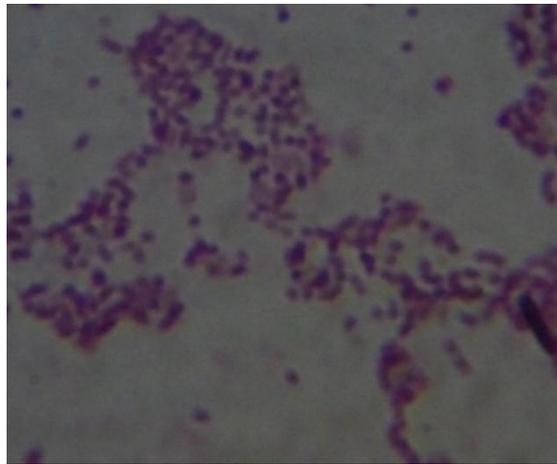
	forme	Gram
SS	coccobacille	-
UV1	Bâtonnée	+
UV2	Bâtonnée	-
UV3	Cocci	-
UV4	Bacille	+
T	Bâtonnée	-



(A) : Coccobacille à GRAM -



(B) : Bâtonnet à GRAM+



(C) : Cocci à GRAM+

Figure 12 : Aspect microscopique des souches

IV- Identification biochimique

IV-1 Attaque glucidique

✓ Mannitol-Mobilité

Les souches qui fermentent le mannitol changent la couleur du milieu alors les bactéries qui sont dépourvues de cette activité gardent sa couleur initiale. La mobilité est observée uniquement chez la bactérie sauvage donc, on peut conclure que l'activité antigénique flagellaire est déléetée.



Figure 13 : (A) : L'aspect de milieu mannitol-mobilité avec les souches mutantes d'*E.coli*

(B) : tube non ensemencé

✓ Citrate de Simmons

Un résultat positif se manifeste par une alcalinisation du milieu qui devient bleu, c'est le cas de la souche UV4. Alors les autres bactéries ne provoquent aucun changement.



Figure 14 : (A) : UV4 citrate de Simmons+ (B) : tube non ensemencé

✓ Triple-Sugar- Iron (TSI)

On note que toutes les souches dégradent le glucose, le saccharose ainsi le lactose, cette activité se manifeste par un changement de couleur de culot et la pente (rouge → jaune) sans dégagement du gaz CO_2 . Les souches UV2, UV3 et UV4 produisent le gaz sulfuré.

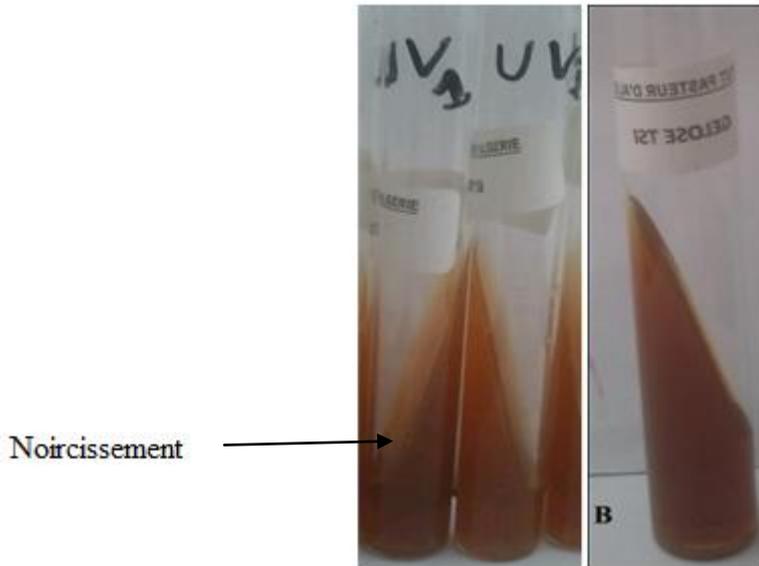


Figure 15 : souches UV1 H_2S^+ (B) : tube TSI non ensemencé

✓ Clark et Lubs

• Tests VP :

La mise en évidence de l'acétoïne est réalisée par la technique de BARRIT, toutes les souches testées sont VP+



Figure 16 : (A) : souche VP+. (B) : milieu Clarck et Lubs

- **Réaction RM :**

Toutes les bactéries présentent une RM- veut dire que le milieu après incubation devient neutre (production de bases)



Figure 17 : Bactérie RM-

- ✓ **Milieux Moeller-Falkaw**

Les bactéries présentent une réaction positive veut dire que toute les souches douées d'une décarboxylase pour les deux acides aminés (ADH+, ODC+) pour LDC : tous les souches (S.S, T, UV1, UV2, UV3, UV4) sont décarboxylase (-).



Figure 18: A : Bactérie décarboxylase (+), B : Bactérie décarboxylase (-)

- ✓ **Milieu Urée-indole**

L'hydrolyse de l'urée est décelée par virage de couleur du milieu (orange → rose) : alcalinisation du milieu qui est observée chez la totalité des souches testées.

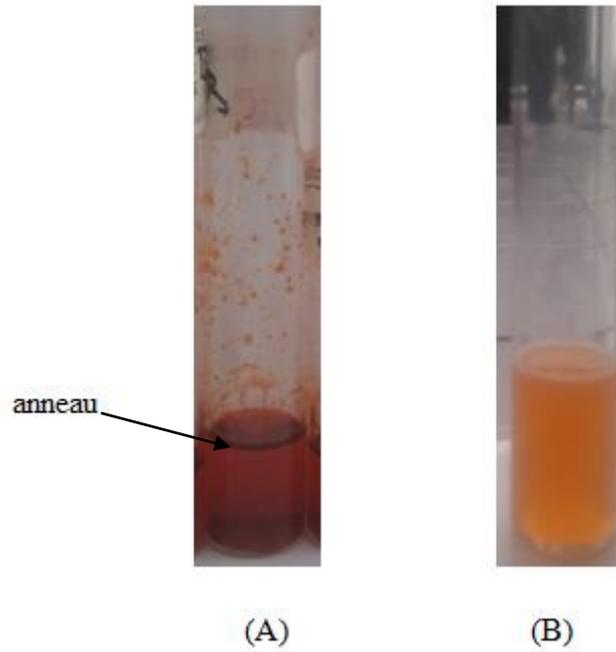


Figure 19 : (A) : test d'uréase + et d'indole +. (B) : tube non ensemencé

Tableau 4: Tableau présente les caractères biochimiques des souches d'*E.coli*

Souches		SS	T	UV1	UV2	UV3	UV4
test							
TSI	Glu	+	+	+	+	+	+
	Lac, Sac	+	+	+	+	+	+
	Gaz	-	-	-	-	-	-
	H ₂ S	-	-	+	+	+	+
Mannitol	Mannitol	+	+	-	-	-	+
Mobilité	Mobilité	-	+	+	+	+	+
Citrat		-	-	-	-	-	+
Clarck et Lubs	VP	+	+	+	+	+	+
	RM	-	-	-	-	-	-
Urée Indole	Uréase	+	+	+	+	+	+
	Indole	+	+	+	+	+	+
Milieu Moeller	ADH	+	+	+	+	+	+
	ODC	+	+	+	+	+	+
	LDC	-	-	-	-	-	-

V- L'antibiogramme

Comme nous l'avons mentionné précédemment chaque souche a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité aux différents antibiotiques (L, MZ, CRO, AMX, P, PI, S, DO), les résultats obtenus sont représentés dan le tableau suivant :

Tableau 5 : résultat de test de l'antibiogramme S :(+) R :(-)

ATB \ souches	L	MZ	CRO	AMX	P	PI	S	DO
S.S	-	+	-	+	-	+	+	+
T	-	+	+	-	-	+	+	+
UV1	-	+	-	+	-	+	+	+
UV2	-	+	-	-	-	+	+	+
UV3	-	+	-	+	-	+	+	+
UV4	+	+	-	+	-	+	+	+

Les bactéries présentent un résultat hétérogène concernant les antibiotiques L, CRO, AMX

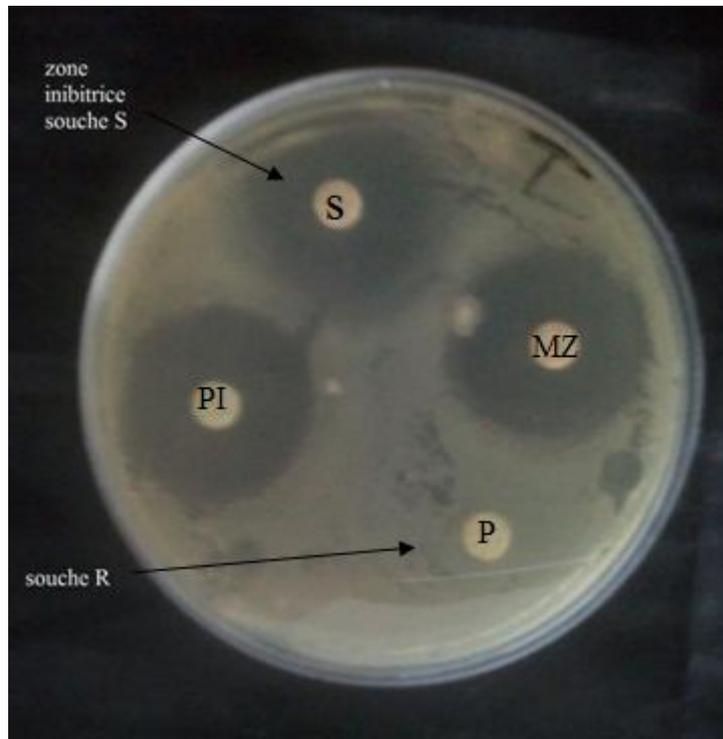
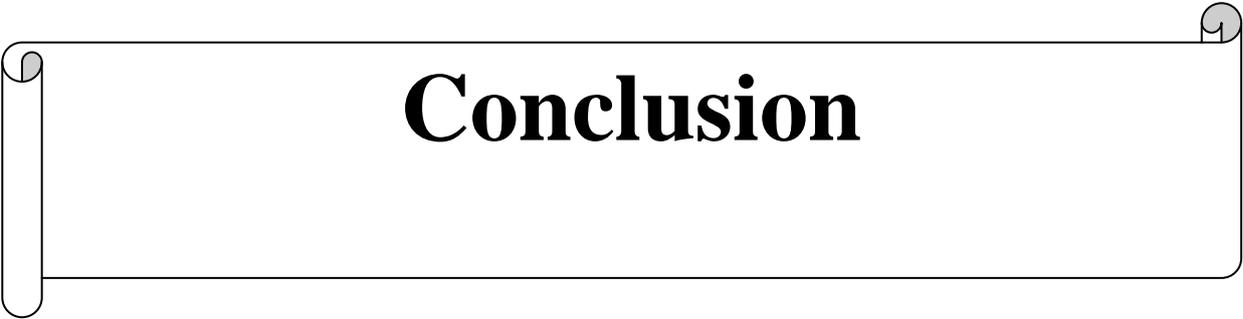


Figure 20: présentée une souche sensible et résistante aux ATB



Conclusion

Conclusion

Escherichia coli est la bactérie la plus étudiée et le microorganisme expérimental de choix pour beaucoup de microbiologistes, cette bactérie majeure de côlon des humains et des animaux. Par ailleurs, c'est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires.

Ce travail avait pour objectifs de comparer l'effet de deux agents mutagènes physiques (Choc thermique et les rayant UV) chez *E. coli*

Après détection des mutants, toutes les souches mutantes (incapables de se développer sur un milieu sélectif) et la souche sauvage ont été caractérisées phénotypiquement par des méthodes biochimiques et l'établissement de l'activité antibactérienne.

Les mutants ainsi isolés ne possèdent pas le même phénotype que celui de la souche sauvage ;

SS: GRAM-, mobilité (-), Man (+), Cit (-), Glu (+), H₂S (-), Gaz (-), Lac, Sac (+), RM (+), VP (+) ADH (+), ODC (+), LDC (-)

UV1: GRAM+, mobilité (+), Man (-), Cit (-), Glu (+), Lac, Sac (+), H₂S (-), Gaz (-), RM (+), VP (+), ADH (+), ODC (+), LDC (-)

UV2: GRAM-, mobilité (+), Man (-), Cit (-), Glu (+), Lac, Sac (+), H₂S (+), Gaz (+), RM (+), VP (+), ADH (+), ODC (+), LDC (-)

UV3: GRAM-, mobilité (+), Man (-), Cit (-), Glu (+), Lac, Sac (+), H₂S (+), Gaz (+), RM (+), VP (+), ADH (+), ODC (+), LDC (-)

UV4: GRAM+, mobilité (+), Man (+), Cit (+), Glu (+), Lac, Sac (+), H₂S (+), Gaz (+), RM (+), VP (+), ADH (+), ODC (+), LDC (-)

T : GRAM-, mobilité (+), Man (+), Cit (-), Glu (+), Lac, Sac (+), H₂S (-), Gaz (-), RM(+), VP(+), ADH(+), ODC(+), LDC(-)

Parmi les résultats obtenus, on conclure que, les souches mutées me présentent pas le meme phénotype que la S S : soit au niveau de la fermentât des sucres testés ou au niveau de la mobilité ainsi pour le test de l'ATB, on remarque qu'il ya une certains systèmes de résistance qui sont développe ou le meme système qui à été réprimé.



Références bibliographiques

Les références de mémoire

1. **Avril J.L, Dabernat H, Denis F et Al** : Bactériologie clinique, Ellipses 2000 : 601.
2. **Avril J.L, Dabernat H, Denis F, Monteil H** : Bactériologie clinique, Ellipses, Paris, 2000, 2^{ème} édition : P 171-177.
3. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H** : la bactériologie clinique, 2^{me} édition, (section 4) 1987 : P : 149.
4. **Bakhoun I** : controle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne, thèse de doctorat en pharmacologie de l'université de Dakar 2004 P8.
5. **Bousseboua H** : Eléments de Microbiologie 2^{ème} édition, Edition Campus-Club Algerie 2005, P69-73.
6. **Daniel P, Claire G, Christopher P** : muni manuel de microbiologie 2014, P 135.
7. diseases physician? *Clin Infect Dis* **45**, 1025-9 (2007).
8. **Dupont, J.Y** : Mutation, mutagenèse et réparation de l'ADN. A partir d'un article de Beth A. Montelone, Division of Biology, Kansas State University 2001
9. **Escobar-Paramo P, et Al** : A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in Escherichia coli. *Mol Biol Evol* **21**, (2004) p 94.
10. **Ewing W.H, Edwards P.R** : the principal divisions and groups of Entérobactériaceae and their differentiation *Buff Bacterol Nomencl Taxon* 1960:10:1-12.
11. **Goubau P, Pellegrims E** : Repères en microbiologie, édition Garant. 2000 P : 391.
12. **James B, Kaper, James P, Nataro, Harry L T** : Mobley-(Pathogénic Escherichia coli) *Nat Rev Microbiol* 2004 ; 2 :123-140.
13. **Joly B, Raynaud A** : Entérobactéries : systématique et méthode de diagnostic. Edition Lavoisier Paris 2003 P : 356.
14. **Kamoun.P,Lavoinnie.A,Verneuil.H et Al** ;Editions Flammarion Printed in France 2003.
15. **Keseler I.M., Bonavides-Martinez C, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Gunsalus R.P, Johnson D.A, Krummenacker M, Nolan L.M, Paley S, Paulsen I.T, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Shearer A.G, & Karp P.D, EcoCyc** : a comprehensive view of Escherichia coli biology. *Nucleic Acids Res*, **37** (Database issue), 2009 P 464–70.

16. **Le Minor L, Richard. C** : Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries. Institut pasteur, publication 1993
17. **Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et Al** : Manual of clinical Microbiology. In American Society for Microbiology, 7th edition Washington 1999 P: 442-458.
18. **Nicklin, J; K. Graeme-Cook; T. Paget; R. Killington** : L'essentiel en microbiologie. Port Royal livres. BERTI Editions 2000 p: 113-121.
19. Organisation mondiale de la santé : 1Belgique, 2Danemark, 3Belgique, 4 Suisse, 1994
20. **Pilet C, Bourdon J L, Toma B, et Al** : les entérobactéries : Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne Doins Paris.1979.P :109-187.
21. **Robins-Browne R, Hartland E.L** : Advances in pediatric gastroenterology and hepatology. Escherichia coli as a cause of diarehea. J. Gastroentero. Hepatol P 467-475.
22. **Shulman S.T, Friedmann H.C, Sims R.H** : Theodor Escherich: the first pediatric infectious 2007.
23. **Vandepitte1 J.K, Engbaek2 P.Piot3, C.C.Heuk4** : Bactériologie clinique: techniques de base pour le laboratoire Prélèvements de matière fécale, écouvillonnage, préparation de suspension de matière fécale, ensemencement des boites de gélose. p : 37
24. **Winter, P C G. I. Hickey; H. L Fletcher** : L'essentiel en génétique. Port Royal livres. BERTI Editions (2000) p : 101-115.
25. **Anonyme**, <http://www.microbe-edu.org/etudiant/entro.html>.2014.

Annexe

Tableau :Les nombres des colonie exposition aux UV

Temp des exposition aux UV (s)	0	10	20	30	40
Nomper des colonies	50	35	18	15	12

Compositions des milieux utilisés

Milieu Urée-Indole

L- Tryptophane	3g
Phosphate mono potassique	1g
Phosphate bi potassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Alcool à 95°	10ml
Rouge de phénol	0,025g
Eau distillée	1l
PH	7
Autoclaver 15min à 121°C	

Milieu Clark-Lubs

Peptone tripsique de viande	5g
Phosphate bipotassique pur en poudre	5g
D (+) glucose	6g
Eau distillée	1l
PH	7.5

Milieu Bouillon nutritif

Tryptone	10,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
PH	7.2
Autoclaver 15min à 121°C	

Milieu EMB

Peptone pancréatique de gélatine	10 g
----------------------------------	------

Annexe

Phosphate dipotassique (PO ₄ K ₂ H)	2g
Lactose	10g
Eosine jaune	0.4g
Bleu de méthylène	0.065g
Agar	15g
PH	6.8

Autoclaver 15min à 121C°

Milieu Manitole-Mobilité

Peptone	20g
Nitrate de K (kNO ₃)	1g
Mannitol	2g
Rouge de phénol à 1%	4ml
Agar	4g
PH	8.1

Autoclaver 15min à 121°C

Milieu Citrate de Simmons

Sulfate de Mg	0.2g
Phosphate mono-ammoniaque	1g
Phosphate dipotassique	1g
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium (NaCl)	5g
Bleu de bromothymol	0.08g
Agar	12g
PH	6.8

Autoclaver 15min à 121°C

Milieu TSI

Tryptone	14g
Extrait autolytique de levure	3g
Extrait de viande	3 g
Glucose	1g
Lactose	10g
Saccharose	10 g
Chlorure de sodium	5 g

Annexe

Thiosulfate de sodium	0,3 g
Citrate ferrique ammoniacal	0,3 g
Rouge de phénol	24 mg
Agar	13.5 g
PH	7.4

Milieu GN

Peptone	10g
Extrait de viande	4g
NaCl	2.5g
Gélatine	120
PH	6.8

Autoclaver 15min à 121°C

Milieu minimum

Na ₂ HPO ₄	12.8g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0.5g
NH ₄ Cl	1g
MgSO ₄ 1M	1ml
Glucose 20%	20ml
CaCl ₂ 0,1M	1ml
L-tryptophane 100 mg/ml	2ml
PH	7.4

Milieu Mueller-Hinton

Hydrolysât acide de caséine	17.5g
Infusion de viande	2g
Amidon soluble	1.5 g
Agar	17g
PH	7.3

<p style="text-align: center;">DJAALEB NESRINE</p> <p style="text-align: center;">AIDOUCI SALIHA</p>	<p style="text-align: center;"><u>Année Universitaire :</u></p> <p style="text-align: center;">2014-2015</p>
<p style="text-align: center;"><u>THEME</u> : Etude comparative entre l'effet de deux agents mutagènes physique chez <i>Escherichia coli</i></p>	
<p>Nature du Diplôme : Master</p> <p>Domaine : Science de la Nature et de la Vie</p> <p>Filière : Génétique Moléculaire</p>	
<p style="text-align: center;">Résumé</p> <p>Une mutation est un évènement fortuit qui se traduit par le changement d'un caractère héréditaire. Ce phénomène est assez rare et considéré comme des erreurs du processus d'autoreproduction conforme du matériel génétique.</p> <p>Dans la présente étude, au défaut de la non disponibilité des agents mutagènes chimiques, l'induction des mutants chez <i>E.coli</i> est réalisée par l'emploi d'agents mutagène physiques en l'occurrence les ultra-violet (UV) et le choc thermique.</p> <p>Après avoir détectés les mutants, toutes les souches y compris la souche sauvage sont identifiées phénotypiquement (galerie biochimique, coloration de GRAM, l'établissement de l'activité antibactérienne).</p> <p>Les résultats obtenus ont montré que les caractères de biosynthèse des acides aminés ou de dégradation des sucres n'ont pas été détectés ainsi l'activité uréasique.</p> <p>Alors que le GRAM été changé aussi la forme de la bactérie, on note aussi que l'activité antigénique flagellaire a té également délitée. Ceci confirme la nature même des mutations, celle d'être induite.</p>	
<p>Mots clés : <i>Entérobactériaceae, Escherichia coli</i>, identification, mutation, résistance aux antibiotiques.</p>	
<p>Laboratoire de stage : laboratoire de la microbiologie à l'Universitaire des frère Mentouri.</p>	
<p>Membres du jury :</p> <p>Mm. Gharzouli R, Maitre de conférences président du jury</p> <p>Mm. Bachkri S, Maitre Assistant, examinateur</p>	<p>Rapporteur :</p> <p>Saoudi M</p>