



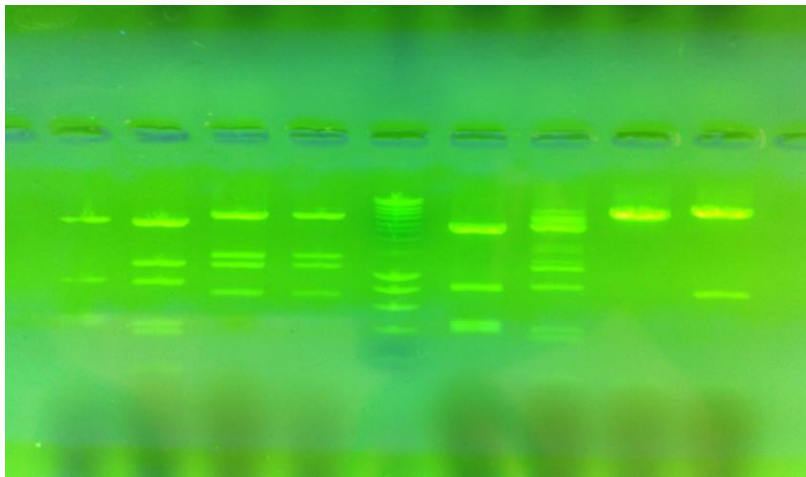
UNIVERSITÉ DE FRIBOURG
UNIVERSITÄT FREIBURG

Valise Pédagogique: À la découverte de l'ADN
Une collaboration entre l'Université de Fribourg
et le Musée d'histoire naturelle de Fribourg

Résistance bactérienne aux antibiotiques

Protocole pour les élèves

BOSCO-CLEMENT Geneviève¹, CONUS Sébastien¹, DECREY Guillaume¹, JANETT Elia¹,
PAGE Carmen¹, RENEVEY Valentine¹, VIAL Anne-Julie¹



Un travail dirigé en collaboration par le D^r Marie-Pierre Chevron et le D^r Chantal Wicky³

¹ Enseignants de biologie

² D^r en biologie, Maître d'Enseignement et de Recherche en Didactique de la biologie
– CERF - Département des sciences de l'Education de l'Université de Fribourg.

³ D^r en Biologie, Maître Assistant - Département de biologie - Faculté des sciences de l'Université de Fribourg.

Relecture : Luc Le Grand, Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild

INTRODUCTION

Avec l'usage massif d'antibiotiques, de plus en plus de bactéries ne réagissent plus aux traitements. Cette résistance est devenue un réel problème pour soigner les patients.

De nos jours, on entend souvent parler du staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) qui provoque régulièrement des épidémies dans les hôpitaux. Cette bactérie n'a cependant pas toujours été problématique. La souche résistante n'est

apparue que dans les années 1960, soit 2 ans après le début de l'utilisation de la méthycilline, introduite sur le marché pour traiter le staphylocoque doré. Alors que la souche non résistante peut encore être traitée par une dizaine d'antibiotiques, la souche résistante ne serait sensible plus qu'à deux antibiotiques connus à ce jour : la vancomycine et le lynezolid. Actuellement, seule la vancomycine est utilisée pour lutter contre le staphylocoque doré résistant, le deuxième antibiotique étant gardé comme réserve dans l'éventualité du développement d'une nouvelle résistance.



VOTRE TRAVAIL SCIENTIFIQUE

Imaginez que vous êtes médecin dans un hôpital. Un de vos patients présente une blessure avec une vilaine infection et vous craignez que cette plaie se développe en fasciite nécrosante qui peut être causée par les 4 bactéries suivantes : *Streptococcus piogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Clostridium perfringens* ou *Staphylococcus aureus*. Ce type d'infection atteint la peau et les tissus sous-cutanés. Les toxines libérées par les bactéries tuent les cellules et provoquent une nécrose de la peau qui peut devenir mortelle si elle n'est pas traitée rapidement. En effet, quelques heures suffisent pour que cette infection devienne sévère.

Dans un premier temps, vous faites une culture sur milieu sélectif afin de déterminer laquelle de ces 4 bactéries est responsable de l'infection. Suite aux premiers résultats, vous découvrez que la bactérie responsable est le staphylocoque doré. Vous devez maintenant déterminer si cette souche est résistante aux antibiotiques ou non afin d'administrer le traitement adéquat au patient. Comme le cas du staphylocoque est délicat, il est important de ne pas utiliser l'antibiotique actif contre la souche résistante pour rien. Mettre en culture des bactéries dans un milieu contenant un antibiotique donné pour en évaluer l'impact demande au moins 24 à 48h00 de culture dans les conditions stériles. Cela demanderait également une grande prudence lors de la destruction par la suite d'une culture de bactéries résistantes. Des recherches ont mis en évidence que l'acquisition de la résistance à l'antibiotique par la bactérie s'accompagne d'une modification de son profil génétique (ou empreinte génétique). Pour observer cette empreinte, vous allez donc analyser l'ADN des staphylocoques dorés isolés préalablement. Vous recevrez un tube contenant l'ADN des bactéries prélevées d'un patient, dont la souche est à déterminer.

CONTENUS

Cet atelier expérimental et ses fiches pédagogiques proposent d'illustrer les notions d'empreinte génétique, d'ADN, d'enzyme de restriction, d'acquisition de résistance aux antibiotiques et de présenter la technique de biologie moléculaire classique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

Les fiches pédagogiques accompagnant l'expérience permettent de guider le travail et d'approfondir certains concepts : ADN, gènes, mutations, enzymes de restriction, applications du polymorphisme de restriction, résistance aux antibiotiques.



BASES THÉORIQUES

Fiche 1 : Enzymes de restriction et RFLP

Fiche 2 : Electrophorèse en gel d'agarose

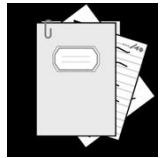
Fiche 3 : Résistance aux antibiotiques



MANIPULATIONS

Fiche 4 : Matériel et sécurité

Fiche 5 : Protocole expérimental



Comparaison de deux ADN polymorphes

Des échantillons d'ADN peuvent être comparés afin de savoir s'ils diffèrent dans leurs séquences nucléotidiques. Les échantillons d'ADN peuvent provenir de n'importe quel organisme vivant. Il peut s'agir d'échantillons de patients pour la détection d'une maladie génétique, d'échantillons prélevés sur une scène de crime, d'échantillons de différentes espèces animales ou végétales à comparer, ...

Digestion enzymatique et enzymes de restriction

La digestion enzymatique est une technique utilisant des enzymes de restriction pour découper l'ADN. Une enzyme de restriction hydrolyse n'importe quel fragment d'ADN si celui-ci présente une courte séquence spécifique (site de restriction) allant de 4 à 8 nucléotides. Chaque enzyme possède un site de reconnaissance propre. Si une séquence d'ADN possède cette séquence spécifique, elle est fragmentée par l'enzyme, sinon elle reste intacte.

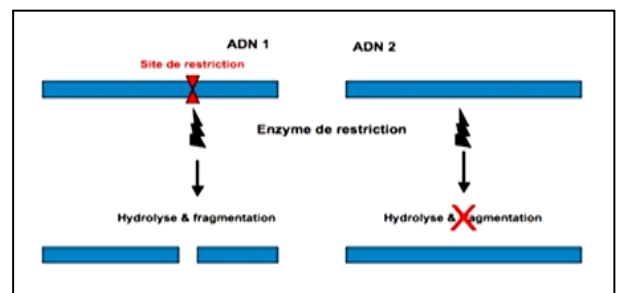
Les premières enzymes de restriction ont été découvertes en 1962 par le suisse Werner Arber. Il a montré que ces enzymes servent

aux bactéries, dépourvues de système immunitaire, pour se défendre contre les virus (phages) qui les infectent. Elles sont capables de couper l'ADN du phage au niveau de sites de restriction différents en fonction des enzymes.

En 1970, l'Américain Hamilton O. Smith purifie la première enzyme de restriction (HaeI) à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*. L'année suivante, son compatriote Daniel Nathans l'utilise pour découper l'ADN du virus SV40. Ces trois chercheurs recevront, en 1978, le prix Nobel de médecine.

On a depuis isolé une centaine de ces enzymes de restriction, véritables ciseaux moléculaires qui permettent de couper l'ADN à volonté et qui ont permis de développer un nombre considérable de techniques en génie génétique. Parmi celles-ci, la production d'organismes génétiquement modifiés, ou bien encore la méthode (décrite ci-dessous) dite des RFLP ; cette dernière méthode étant aujourd'hui incontournable en biologie contemporaine.

Exemples de sites de restriction	
PstI	XhoI
5' ...CTGCA▼G... 3'	5' ...C▼TCGAG... 3'
3' ...G▲ACGTC... 5'	3' ...GAGCT▲C... 5'



Polymorphismes de longueurs des fragments de restriction : RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Les polymorphismes de longueurs des fragments de restriction s'appuient sur les propriétés particulières des enzymes de restriction. Celles-ci coupent indifféremment les régions d'ADN codantes et non-codantes en reconnaissant des sites de restriction spécifiques qui peuvent être présents en plus ou moins grand nombre. La petite taille des sites de restriction et leur grand nombre dans un génome les rendent particulièrement sensibles à tout changement de séquence nucléotidique : mutations par délétion, insertion, translocation chromosomique ...

Les enzymes de restriction sont donc utilisées pour révéler le polymorphisme existant entre des ADN provenant d'un génome, d'un gène isolé, d'un plasmide, etc.

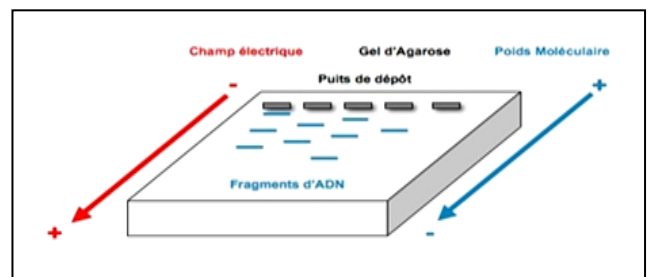
Seule ou associée à d'autres techniques (PCR et hybridation moléculaire principalement), la méthode RFLP est utilisée afin d'identifier des espèces, des variétés, des individus. Elle permet d'établir des phylogénies moléculaires, de diagnostiquer certaines maladies génétiques, d'établir une filiation, ou encore de rechercher un coupable dans une enquête criminelle.

Migration par électrophorèse

Les fragments obtenus par digestion enzymatique sont déposés dans un gel d'agarose puis soumis à un champ électrique. Ils vont ainsi migrer dans le gel suivant leur poids moléculaire (les petits rapidement, les grands plus lentement).

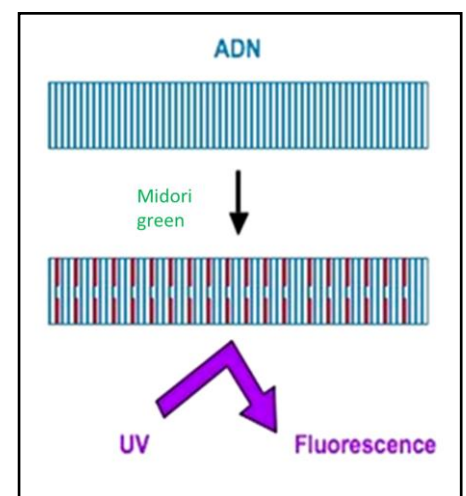
L'ajout d'un colorant permet d'augmenter la densité de la solution contenant les fragments d'ADN et de suivre leur migration dans le gel.

👉 Détails : cf. Fiche 2



Révélation du gel

Après migration, les fragments d'ADN n'étant pas visibles à l'œil nu, il faut procéder à une étape de révélation. Pour cela on a précédemment ajouté au gel un composé chimique, le Midori green, qui se fixe sur l'ADN et fluoresce sous lumière bleue. Il est également possible d'utiliser d'autres produits de révélation.

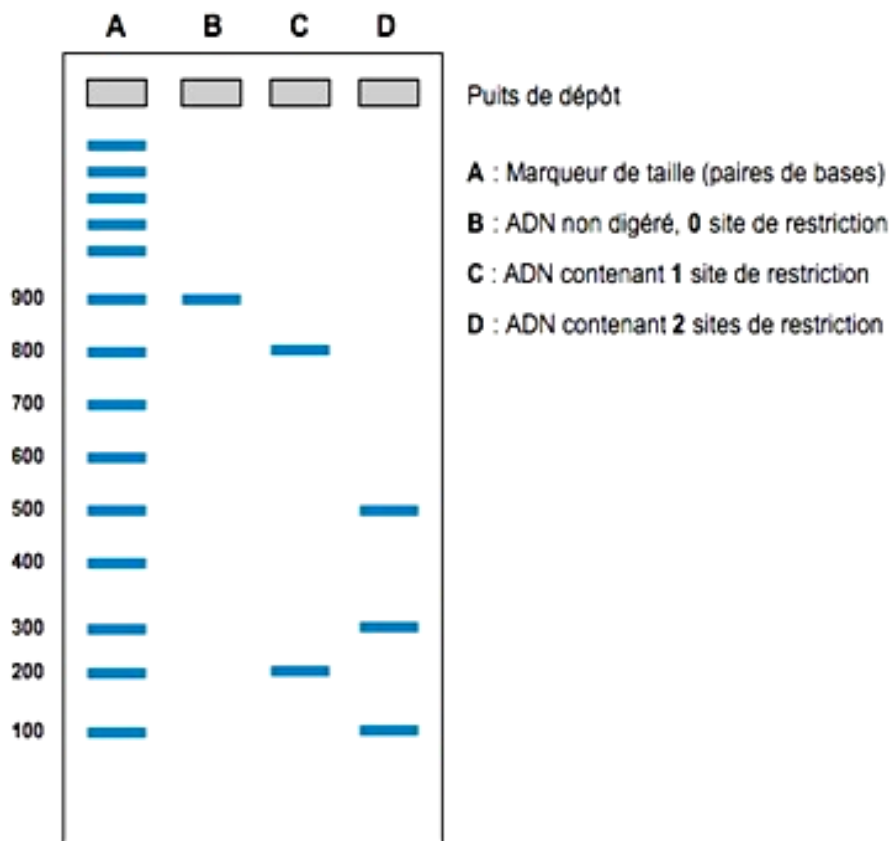


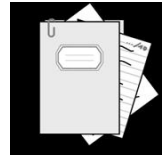
Analyse des profils obtenus

Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'une photographie montrant les bandes d'ADN fluorescentes à la lumière bleue.

Un échantillon non digéré apparaît sous la forme d'une bande unique. Un échantillon soumis à hydrolyse présente une ou plusieurs bandes de tailles différentes en fonction du nombre de sites de restriction qu'il contient.

La taille des morceaux d'ADN obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de référence constitué de fragments d'ADN dont la taille est connue et standardisée.



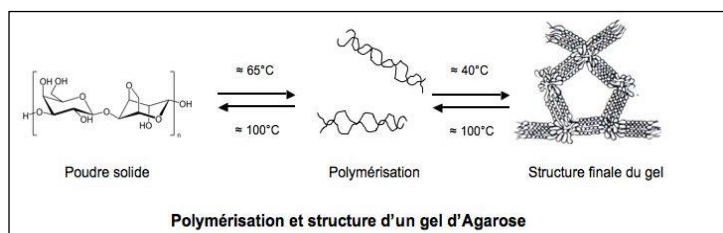


Cette méthode permet de séparer des fragments linéaires d'ADN linéaires selon leur poids moléculaire en les soumettant à un champ électrique linéaire dans un gel poreux.

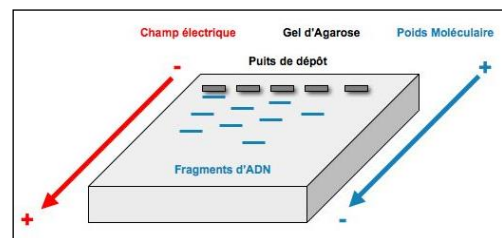
Une molécule d'ADN est un polynucléotide, chaque nucléotide est composé de 3 types de résidus : le désoxyribose, la base azotée, le groupement phosphate H_2PO_4 qui peut s'ioniser en PO_4^{2-} .

En milieu basique, le tampon TAE utilisé a un pH proche de 8, l'ADN va se charger négativement ($H_2PO_4 \rightarrow 2 H^+ + PO_4^{2-}$), et devient une chaîne polyanionique. La charge électrique est uniforme et, les molécules vont donc migrer en direction de la borne positive, c'est pourquoi on effectue les dépôts du côté de la borne négative.

L'agarose est un polymère gélifiant à base d'agar-agar purifié composé essentiellement de galactose non ramifié. Il est extrait de la paroi cellulaire de certaines algues rouges. On le retrouve sous des formes moins pures pour la fabrication des milieux de cultures *in vitro* et comme additif alimentaire (E 406).

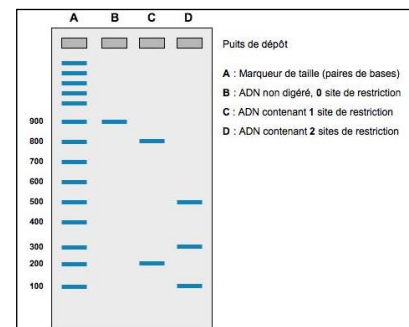


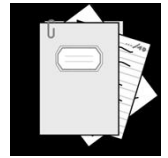
La migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique va se réaliser dans l'épaisseur du gel poreux d'Agarose dans lequel l'ADN a été déposé. Les pores de ce gel vont se comporter comme un tamis qui freine le déplacement des fragments d'ADN. La résistance du gel à la migration des fragments est proportionnelle à leur taille, les plus petits fragments migrent le plus vite donc le plus loin.



La concentration du gel en agarose va influencer sur la résolution de celui-ci. Plus un gel est concentré en Agarose, plus il permet de séparer des fragments de petite taille ou des fragments ne différant que de quelques nucléotides. Si la résolution est insuffisante, trop peu d'Agarose ou trop d'ADN semblable, on obtient généralement une traînée (« smear »). La limite usuelle de résolution se situe aux environs de 300pb. Pour des séparations plus fines, il faut généralement recourir à des gels de polyacrylamide.

On remarquera que l'épaisseur et la fluorescence des bandes visualisées sur le profil électrophorétique décroît avec la distance au dépôt. Ceci est dû à certaines propriétés du Midori Green. Celui-ci est fluorescent aux rayons UV, et se fixe entre les bases de l'ADN. La quantité de Midori Green de chaque bande est proportionnelle au nombre de nucléotides d'ADN sur lequel il s'est fixé. L'épaisseur et la fluorescence des bandes d'électrophorèse, vues sur la table UV/ lampe LED, est donc proportionnelle à la taille des ADN: ce sont bien les ADN les plus gros qui migrent le moins loin.



**Qu'est-ce que c'est ?**

La résistance est un phénomène par lequel des organismes parviennent à supporter un agent qui leur est normalement défavorable, ou éventuellement conçu pour les tuer ou les inhiber. Dans le cas des bactéries, cette résistance peut se développer au contact répété d'un antibiotique dont la posologie n'est pas respectée ou lorsque le traitement est interrompu avant l'échéance prévue. Ce genre de comportement favorise la sélection des bactéries qui résistent mieux à l'antibiotique assimilé. Lorsque le traitement est interrompu, les bactéries devenues résistantes, qui sont présentes en plus grand nombre, vont se multiplier. La prochaine fois que le même antibiotique sera administré, il n'aura plus aucun effet puisque les bactéries présentes dans l'organisme ne seront plus sensibles à cette substance.

Les différents mécanismes de résistance

Pour être efficace, un antibiotique doit pouvoir inhiber la synthèse de la paroi bactérienne, changer la perméabilité de la membrane cytoplasmique, inhiber la synthèse des protéines ou encore interférer dans le métabolisme des acides nucléiques.

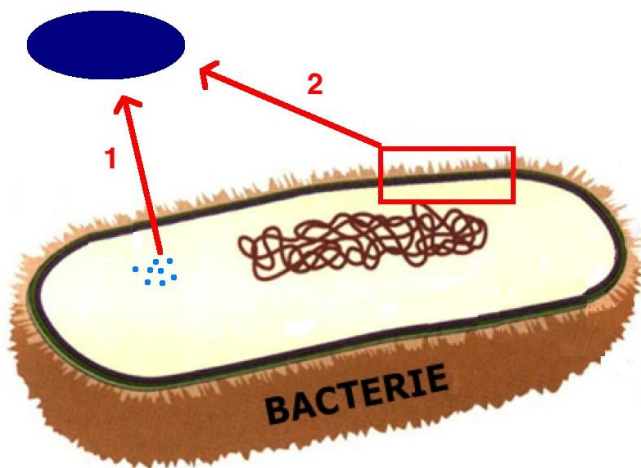


Figure 1 : mécanismes de résistance chez la bactérie

De façon générale, on distingue 4 mécanismes de résistance différents chez les bactéries (figure 1) :

1. La bactérie produit des enzymes qui inactivent l'antibiotique. Ces enzymes sont produites à l'intérieur de la cellule puis excrétées à l'extérieur de la bactérie pour inhiber l'antibiotique (flèche 1).
2. La bactérie empêche l'accès de l'antibiotique à sa cible à l'aide d'une pompe présente dans la membrane cytoplasmique (flèche 2).
3. La paroi bactérienne est renforcée, ce qui empêche l'antibiotique d'accéder à sa cible (flèche 2).
4. La bactérie présente des protéines modifiées : la cible de l'antibiotique est altérée, ce qui empêche son action.

Le cas du staphylocoque doré

Les antibiotiques de type méthycilline agissent sur les staphylocoques en inhibant une protéine (la PBP) qui est impliquée dans la production de la paroi bactérienne. La résistance du staphylocoque doré est due à l'acquisition du gène *mecA* qui produit cette même protéine mais modifiée (la PBP2A). Cette dernière n'est pas inhibée par les antibiotiques de type méthycilline et peut donc assurer sa fonction dans la synthèse de la paroi.

Le gène *mecA* fait partie d'une séquence d'ADN (cassette) qui s'insère dans le chromosome bactérien. Les staphylocoques dorés résistants produisent donc les deux protéines : la PBP qui est inhibée par l'antibiotique et la PBP2A qui prend le relais de la PBP et assure sa fonction dans la synthèse de la paroi.



1. Sécurité et bonnes pratiques de laboratoire

Ce travail pratique requiert rigueur, habileté et respect des règles d'hygiène et de sécurité. Il faut donc prêter attention aux consignes suivantes :

- ✓ Le matériel de laboratoire est fragile et onéreux
Manipulez-le avec le plus grand soin, en particulier les centrifugeuses, micropipettes et générateurs d'électrophorèse.
- ✓ Le matériel biologique est sensible à la température et aux contaminations
Veillez à la propreté des plans de travail, des mains et du matériel de paillasse. Respectez les indications de température notamment pour le stockage des enzymes. Annotez clairement tous les tubes en précisant leur contenu et l'opérateur.
- ✓ Certains appareils et produits sont potentiellement dangereux
En particulier, la manipulation des gels contenant le Midori Green (cancérigène) doit se faire avec des gants en latex. Les UV peuvent provoquer de graves brûlures. En cas d'exposition directe, il convient donc de porter des gants et de se protéger avec un masque adapté.

Une zone de travail dédiée à l'utilisation du Midori Green doit être aménagée. En particulier, on place un papier absorbant sous les cuves d'électrophorèse. Avant rangement dans la valise, tout le matériel est nettoyé méticuleusement afin d'éliminer toute trace de Midori Green (cuve, support, chambre de révélation ...).

➔ **En cas de doute, ne pas hésiter à demander de l'aide.**

2. Matériel à disposition

Laboratoire :

Micropipettes
Centrifugeuse
Portoirs pour microtubes
Incubateur
Balance de précision
Micro-onde
Support de gel et peignes
Cuve et générateur à électrophorèse
Erlenmeyer et éprouvette
Chambre UV ou LED

Réactifs et Consommables :

Pointes de pipette
Microtubes
Eau distillée stérile
Tampon TAE (Tris-Acétate, EDTA)
Agarose
Midori Green
Tampon de charge
Marqueur de taille
Tampon de digestion
Gants en latex

Matériel biologique :

Échantillons ADN pour test, Enzyme Pst1 et son tampon

**1. Digestion enzymatique**

- ✓ Par participant : 1x « ADN Patient» 8 µl
- ✓ Dans des microtubes, réaliser à l'aide de la micropipette les préparations indiquées dans le tableau ci-dessous. Changer d'embout après chaque pipetage.

Faire très attention aux volumes prélevés !

Echantillon	ADN	H2O	Tampon	Enz. Pst1	Vol. final
Echantillon du patient	8µl ADN	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Sensible*	8µl ADN 1	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Résistant*	8µl ADN 2	9 µl	2 µl	1 µl	20µl

*digestions effectuées par l'enseignant

- ✓ Centrifuger rapidement puis incuber les échantillons à 37°C pendant 20-45 min

2. Préparation des gels d'agarose – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Sur la balance de précision peser l'Agarose
- ✓ Avec l'éprouvette graduée mesurer le TAE 1X
- ✓ Dans l'Erlenmeyer mélanger Agarose et TAE, puis porter à ébullition à la micro-onde. (ATTENTION AUX ECLABOUSSURES)
- ✓ Laisser refroidir le mélange 2 minutes puis ajouter le Midori Green (N'oubliez pas les gants!)
- ✓ Couler le mélange dans le support plastique sans faire de bulles, déposer les peignes puis laisser polymériser sans déplacer le gel avant polymérisation complète. Le gel pourra être conservé à 4°C sous plastique (pour éviter qu'il sèche). (Ne pas mettre dans un frigo servant à l'alimentation)

Quantités (dépends de la taille du support de gel):

Support de gel	Agarose	TAE 1X	Midori Green
100 ml	0.65 g	100 ml	10 µl
80 ml	0.55 g	80 ml	8 µl
60 ml	0.4 g	60 ml	6 µl
50 ml	0.35 g	50 ml	5 µl
20 ml	0.15 g	20 ml	2 µl

