



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
BËNMAGHNA FATIMA
 &
BEZAOUCH FAIZA

Thème :

Sélection de quelques mutation phénotypique de Klebsiella pneumoniae et Staphylococcus aureus utilisant la mutagenèse

UV

Soutenue le devant le jury composé de :

Président	Mme. Brahami Nabila	MCA	Université de Mostaganem
Encadreur	Chibani Abdelwaheb	Pr	Université de Mostaganem
Examinateur	Mr. Benali Sid Ahmed	MCB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023/2024

Dédicace

Tout d'abord, je remercie et dédie cette thèse à tous ceux qui ont contribué à construire mon parcours académique, fruit d'années d'études, d'efforts et d'acquisition de connaissances, à ma mère, qui a été mon soutien constant et formidable et motivateur à tout moment. Je le dédie également à mon père, que Dieu ait pitié de lui, et je n'oublie pas de mentionner ma famille pour m'avoir encouragé et poussé vers l'avant, ainsi qu'à mes amis qui ont partagé ce parcours académique avec moi, ainsi que mes professeurs qui ont partagé avec moi leurs expériences et ont eu à cœur de me transmettre le plus de connaissances possibles.

Benmagnia Fatima

Dédicace

J'ai le plaisir de dédicacer cette mémoire à toutes les personnes qui m'ont soutenu dans cette étape de mon parcours académique. Le mémoire de Master est le résultat d'un effort déployé pour trouver un sujet qui consolide mes acquis.

Je dédie mes remerciements à mes parents, à ma mère qui reste mon pilier et mon inspiration, et à mon père qui m'accompagne comme une ombre pour me guider, à ma famille qui m'a motivé à continuer mon chemin, à mes professeurs qui ont partagé avec moi leur vaste expérience de connaissance et à mes amis qui m'ont encouragé.

Bezaouch Faiza

Remerciement

Avec la grâce de Dieu, nous le remercions pour sa grande générosité et pour nous avoir accordé la détermination et la persévérance nécessaires pour mener cette recherche.

Nous remercions particulièrement toutes les personnes qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser notre mémoire de fin d'études.

Nous remercions notre encadreur de mémoire, le professeur **Chibani Abdelwaheb**, de nous avoir fourni de précieux conseils et de riches informations.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à nos familles et amis qui ont été nos plus grands soutiens dans nos moments difficiles.

Nous exprimons nos profonds remerciements à tous les professeurs qui ont partagé avec nous leurs connaissances éclairantes.

Nous remercions **Mme. Brahami Nabila** pour avoir accepté de présider le jury, et nous remercions également **Mr. Benali Sid Ahmed** pour avoir acceptée d'examiner cette mémoire.

Nous tenons également à remercier les techniciens du laboratoire de microbiologie pour nous avoir guidés.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADH : Arginine déshydrogénase

ARN : Acide ribonucléique.

AP : Aminopurine

BU : Bromo-uracile

C : Cytosine

G : Guanosine

K : Klebsiella

LB : Luria bertani

MM : Milieu minimum

MP : Master Plate

Oric : Origine de replication

T : Thymine.

UV : Ultra-Violet.

UFC : Unités formant des colonies. **U** : Uracile.

XIX^{ème} : Au début d'année 1801 et à la fin de 1900

XVII^e : Au début d'année 1601 et à la fin de 1700

Liste des tableaux

Tableau 1 : les éléments indispensables du système de réplication chez les bactéries.

Tableau 2 : la famille d'antibiotique de néomycine et la norofloxacine

Tableau 3 : le nombre de colonies en UFC/ml chez *klebsiella pneumoniae* après l'exposition à l'UV a différents temps.

Tableau 4 : le nombre de colonies en UFC/ml chez *Staphylococcus aureus* après l'exposition à l'UV a différents temps.

Liste des figures

Figure 1 : Formes des bactéries.

Figure 2 : Les flagelles et les fimbriae.

Figure 3 : Coloration de Gram de *Klebsiella pneumoniae*.

Figure 4 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique x4780.

Figure 5 : Structure d'ADN.

Figure 6 : Les tubes de la suspension de témoin de *Klebsiella pneumoniae* avant l'irradiation de UV.

Figure 7 : Les tubes de la suspension de témoin de *Staphylococcus aureus* avant l'irradiation de UV.

Figure 8 : Les tubes de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* après l'irradiation de UV dans un durée de 8 min.

Figure 9 : Les tubes de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* après l'irradiation de UV dans un durée de 16 min.

Figure 10 : Les tubes de la suspension de *Staphylococcus aureus* après l'irradiation de UV dans un durée de 16 min.

Figure 11 : Antibiogramme par disques chez *Staphylococcus aureus* (B),(C) et *Klebsiella pneumoniae* (A).

Figure 12 : La sélection chez *Klebsiella pneumoniae*

Figure 13 : Aspect macroscopique des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur MM(B) et LB(A).

Figure 14 : Aspect macroscopique des colonies de *Staphylococcus aureus* sur LB.

Figure 15 : La croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* avant l'irradiation par UV a dilution de -5 (A) et -6 (B).

Figure 16 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* avant l'irradiation par UV a dilution de -5 (A) et -6 (B).

Figure 17 : La croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* après l'irradiation par UV de durée de 16 min a dilution de -5.

Figure 18 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l'irradiation par UV de durée de 8 min a dilution de -5 (A) et -6 (B).

Figure 19 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l'irradiation par UV de durée de 16 min a dilution de -5 (A) et -6 (B).

Figure 20 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l'irradiation par UV de durée de 16 min a seconde dilution de - 4.

Figure 21 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l'irradiation par UV de durée de 16 min a seconde dilution de – 5.

Figure 22 : Antibiogramme par disques chez *Klebsiella pneumoniae* a différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (A)et 2 mg/ml (B) et 0.4 mg/ml (C)) et de ciprofloxacine (2.5 mg/ml(D) et 0.25 mg/ml(E)).

Figure 23 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après la sélection de master 1(A) et 2(B) et 3(C) et 4(D).

Figure 24 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* avant l'irradiation par UV dans deux concentration d'antibiotique de gentamicine (4mg/ml(A) et 2 mg/ml(B)).

Figure 25 : L'apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM après Répliques sur velours de Master 1.

Figure 26 : L'apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM(A) et LB+ gentamicine de concentration 0.4mg\ml (B) après la Répliques sur velours de Master 2.

Figure 27 : L'apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM(A) et LB+ gentamicine de concentration 4mg\ml (B) et 2mg/ml(C) après la Répliques sur velours de Master 3.

Figure 28 : L'apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM(A) et LB+ gentamicine de concentration 4mg\ml (B) et 2mg/ml(C) après la Répliques sur velours de Master 4.

Figure 29 : Antibiogramme par disques chez *Staphylococcus aureus* a différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (A)et 2 mg/ml (B)) et de ciprofloxacine (0.25 mg/ml (C)).

Figure 30 : La croissance bacterienne des colonies de *Staphylococcus aureus* avant l' UV dans LB solide(A) et LB + différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (B)et 2 mg/ml (C)) et de ciprofloxacine (0.25 mg/ml (D)).

Figure 31 : La croissance bacterienne des colonies de *Staphylococcus aureus* après l' UV dans LB solide(A) et LB + différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (B)et 2 mg/ml (C)) et de ciprofloxacine (0.25 mg/ml (D)).

Figure 32 : le phénotype de *klebsiella pneumoniae*.

Table des matières

Liste des abbreviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Summary

ملخص

Introduction	1
CHAPITRE I	3
I.1 Historique.....	3
I.2 Définition.....	4
I.3 Croissance et reproduction	4
I.3.1 Division cellulaire	4
I.3.2 Croissance et culture des bactéries.....	5
I.4 Structure cellulaire.....	6
I.5 Morphologie et association des bactéries	7
I.6 Génétique.....	8
I.7 Mobilité des bactéries.....	9
I.8 Interaction avec d'autre organismes :.....	10
I.9 Classification et Identification des bactéries	10
I.9.1 Historique du classement	11

I.9.2 Chimio taxonomie	11
I.9.3 Classification génotypique	12
I.9.4 Classification actuelle	12
I.10 La bactérie : <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
I.10.1 Habitat	13
I.10.2 Taxonomie.....	13
I.10.3 Caractéristiques bactériologiques.....	14
I.10.3.1 Caractères morphologiques	14
I.10.3.2 Caractères cultureux	14
I.10.3.3 Les Caractères antigéniques	14
I.10.3.4 Caractères biochimiques	15
I.11 La bactérie : <i>Staphylococcus aureus</i>	15
I.11.1 Habitat	15
I.11.2 Taxonomie.....	16
I.11.3 Bactériologie de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
I.11.3.1 Caractères morphologiques	16
I.11.3.2 Caractères cultureux	17
I.11.3.3 Caractères biochimiques	17
CHAPITRE II.....	18
II.1 ADN	18
II.1.1 Définition de l'ADN	18
II.1.2 Acides nucléiques : Les molécules clés de l'information génétique	19
II.1.3 Le rôle d'ADN	19

II.1.4	Importance de l'ADN dans la compréhension de la vie et de la génétique	19
II.1.5	Structure de l'ADN	20
II.1.5.1	Découverte de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick	20
II.1.5.2	Décoder le puzzle de l'ADN : la révélation de la double hélice.....	21
	De Watson et Crick	21
II.1.5.3	La composition chimique et la structure des acides nucléiques.....	22
II.1.6	Organisation de l'ADN dans les chromosomes.....	23
II.1.7	Structure et diversité des chromosomes chez les bactéries	23
II.1.8	Réplication de l'ADN.....	24
II.1.8.1	Processus de la réplication de l'ADN	24
II.1.9	Rôle des enzymes dans la réplication	26
II.2	Mutations de l'ADN	27
II.2.1	Définition de mutation	27
II.2.2	Mutagenèse dirigée	27
II.2.3	Types et causes des mutations de l'ADN	27
II.2.3.1	Mutation faux-sens.....	27
II.2.3.2	Mutation non-sens.....	27
II.2.3.3	Mutation silencieuse	28
II.2.3.4	Mutation de décalage de cadre.....	28
II.2.3.5	Mutation de duplication	28
II.2.3.6	Mutation suppressive	28
II.2.3.7	Mutation létale conditionnelle	28
II.2.3.8	Mutation d'inversion	28

II.2.4 Les agents mutagènes	29
II.2.4.1 Les agents physiques.....	29
II.2.4.1.1 Rayonnement non ionisant (UV) :	29
II.2.4.1.2 Rayonnement ionisant (rayons X) :	29
II.2.4.2 Les agents chimiques	29
II.2.4.2.1 Les analogues de bases	29
II.2.4.2.2 L'acide nitreux.....	30
II.2.4.2.3 L'hydroxylamine	30
II.2.4.2.4 Les agents intercalants	31
II.2.4.2.5 Les agents alkylants	31
II.2.4.3 Les agents biologiques.....	31
II.2.4.3.1 Les transposons.....	31
II.2.5 Les mécanismes de réparation des mutations dans l'ADN	32
II.2.5.1 La réparation par excision de la base (BER).....	32
II.2.5.2 Réparation par excision de nucléotides (NER).....	33
II.2.5.3 Réparation des mésappariements.....	33
II.2.5.4 Réparation par recombinaison homologue	33
II.2.5.5 Réparation par recombinaison non homologue (NHEJ)	33

CHAPITRE III

III.1 Problématique	35
III.2 Cadre d'étude	35
III.3 Origine des isolats.....	35
III.4 Les milieux de cultures	35

III.4.1 Les milieux solides	35
III.4.1.1 Milieu Luria-Bertani :	36
III.4.1.2 Milieu minimum :	36
III.5 Les milieux liquides	36
III.6 Technique d'étude	36
III.6.1 L'ensemencement	36
III.6.2 Le repiquage	36
III.6.3 Exposition au rayon ultraviolet	37
III.6.3.1 Dilution et étalement	37
III.6.3.1.1 Dilution et étalement de témoin	37
III.6.3.1.2 Dilution et étalement de suspension exposée aux UV	39
III.6.3.2 Antibiogramme par disque	41
III.6.3.2.1 Dilution de L'antibiotique :	42
III.6.3.3 Antibiogramme par disque préparés chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
III.6.3.4 La sélection des mutations chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
III.6.3.4.1 Préparations de milieu LB + Antibiotique	43
III.6.3.5 Témoin de Repiquage sur velours (Velvet replica plating) :	44
III.6.3.6 Repiquage sur velours (Velvet replica plating)	44
III.6.3.7 Antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
III.6.3.7.1 La méthode 1 : Antibiogramme par disque préparés	45
III.6.3.7.2 Préparations de milieu LB + Antibiotique	45
III.6.3.7.3 La méthode 2 : Antibiogramme de LB mélangé avec Antibiotique ...	45
III.6.3.8 Sélection des phénotypes de morphologie	46

IV. Résultats.....	47
IV.1 Aspect macroscopique.....	47
IV.2 L'effet de l'UV sur la survie des isolats.....	48
V. Discussion.....	60
Conclusion et perspectives.....	61
Les Références bibliographies	
Annexe	

Résumé

Ce mémoire vise à identifier et étudier l'effet du rayonnement ultraviolet sur deux types de bactéries sélectionnées (*Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*). Après avoir été absorbé par l'ADN, ce dernier modifie sa structure hélicoïdale ainsi que ses gènes, entraînant un changement dans le mode de vie de la bactérie.

Cette étude a été réalisée en exposant deux isolats bactériens aux rayons ultraviolets pendant deux périodes de temps différentes et espacées, pour *Klebsiella pneumoniae* pendant 8 minutes et 16 minutes, et pour *Staphylococcus aureus* une seule période de 16 minutes, afin de déterminer le taux de mortalité de cellules bactériennes, en plus de la possibilité d'obtenir des mutations phénotypiques de résistance aux antibiotiques, non autotrophes et à changement de taille.

Les résultats de l'exposition de *Klebsiella pneumoniae* et de *Staphylococcus aureus* aux rayons ultraviolets ont montré un taux de mortalité important et varié, ainsi que des colonies de différentes tailles, et aucune mutation n'a été obtenue à partir des autres mutations.

En conclusion, les résultats ont révélé qu'une durée d'exposition de 16 minutes n'était pas suffisante pour éliminer complètement *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* mais qu'elle modifiait leur taille.

Mots clés : rayonnements ultraviolets, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, taux de mortalité, mutations phénotypiques.

Summary

This thesis aims to identify and study the effect of ultraviolet radiation on two types of selected bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*). After being absorbed by the DNA, the latter changes its helical structure as well as its genes, causing a change in the bacteria's lifestyle.

This study was conducted by exposing two bacterial isolates to ultraviolet rays for two different and spaced time periods, for *Klebsiella pneumoniae* for eight minutes and 16 minutes, and for *Staphylococcus aureus* a single time period of 16 minutes, in order to determine the rate of bacterial cell death, in addition to the possibility of obtaining phenotypic mutations of resistance. Antibiotic, non-autotrophic and size-changing.

The results of exposing *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* to ultraviolet radiation showed a large and varied death rate, as well as colonies of different sizes, and no mutations were obtained from the other mutations.

In conclusion, the results revealed that an exposure period of 16 minutes was not sufficient to completely eliminate *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* but it changed their size.

Key words: ultraviolet radiation, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, mortality rates, phenotypic mutations.

ملخص

تهدف هذه الأطروحة الى التعرف ودراسة تأثير الأشعة فوق بنفسجية على نوعين من البكتيريا (المكورات العنقودية والكلبسيلا الرئوية) المنتقاة. إذ تعمل هذه الأخيرة إثر امتصاصها من طرف الحمض النووي على تغيير بنيته الحلزونية وكذا جيناته مسببة تغير في نمط عيش البكتيريا.

تم إجراء هذه الدراسة عن طريق تعريض عزلتين بكتيريتين للأشعة فوق بنفسجية لفترتين زمنيتين مختلفتين ومتباعدتين بالنسبة للكلبسيلا الرئوية لمدة ثمان دقائق و16 دقيقة اما المكورات العنقودية فلفترة زمنية واحدة هي 16 دقيقة وذلك لمعرفة نسبة موت الخلايا البكتيرية بالإضافة الى إمكانية الحصول على طفرات النمط الظاهري من مقاومة المضاد الحيوي وغير ذاتية التغذية وتغيير الحجم.

أظهرت نتائج تعريض الكلبسيلا الرئوية و المكورات العنقودية للأشعة فوق بنفسجية معدل وفاة كبير ومتنوع وكذلك مستعمرات ذات حجم مختلف، كما لم يتم الحصول على أي طفرة من الطفرات الأخرى.

في الختام، كشفت النتائج أن فترة التعرض لمدة 16 دقيقة لم تكن كافية للقضاء تماما على الكلبسيلا الرئوية والمكورات العنقودية ولكنها غيرت الحجم الخاص بهما.

الكلمات المفتاحية: الأشعة فوق البنفسجية، المكورات العنقودية الذهبية، الكلبسيلا الرئوية، معدل وفاة، الطفرات الظاهرية.

Introduction

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. On distingue aussi les bactéries proprement dites (Bacteria) des bactéries primitives (Archaea). **(Nauciel ; Vildé, 2005)** Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μm . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralee (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique. **(Nauciel ; Vildé, 2005)**

La lumière ultraviolette (UV) est mutagène pour tous les virus et les cellules. Ses effets sont causés par des changements chimiques dans les bases qui proviennent de l'absorption de l'énergie de la lumière. Les produits majoritaires formés dans l'ADN après irradiation UV sont des pyrimidines jointes de façon covalentes (dimères de pyrimidine), principalement des thymines, qui sont adjacentes sur le même brin de nucléotides. Cette liaison chimique amène les bases à proximité l'une de l'autre, provoquant une distorsion de l'hélice qui bloque la transcription et transitoirement la réplication de l'ADN. **(Hartl ; Jones, 2003)**

De nombreux types de mutants peuvent être isolés facilement chez les bactéries des mutants auxotrophes, des mutants qui ne peuvent fermenter certaines sources de carbone, des mutants qui résistent à des antibiotiques ou à des substances toxiques telles que les métaux lourds, ou encore des mutants touchés dans des processus cellulaires essentiels. Les mutations qui confèrent ces phénotypes peuvent être spontanées ou induites par des agents chimiques ou des radiations. La recherche de mutants est orientée par la nature du système étudié et le niveau de connaissance qui a été atteint. **(Cunin ,1993)**

Une mutation peut être décelée ou sélectionnée directement dans des conditions de croissance appropriées. Les mutations d'auxotrophie sont décelées par l'absence de croissance du mutant sur un milieu qui ne contient pas le nutriment dont la mutation empêche la synthèse. Les mutations qui confèrent la résistance à un antibiotique ou à une substance toxique sont sélectionnées directement par étalement sur un milieu qui contient l'antibiotique ou la substance en question. Les mutations qui affectent un processus vital font l'objet d'une méthode d'isolement particulière. Il s'agit de mutations létales conditionnelles : leur phénotype (la mort cellulaire) n'est exprimé que dans certaines conditions d'environnement,

non-permissives. **(Cunin ,1993)** La méthode maintenant classique des répliques sur velours (Lederberg et Lederberg, 1952) permet d'analyser un nombre très élevé de colonies pour la présence de mutations. Une boîte de Pétri contenant les colonies est appliquée sur un morceau de velours stérile tendu sur un support cylindrique ou sur un tampon. Le velours garde l'empreinte de chaque colonie en retenant quelques cellules. Il sert ensuite à imprimer des boîtes de milieux de compositions différentes. La comparaison de la croissance des colonies sur les différents milieux permet l'exemple de mu le repérage et une première caractérisation des mutants. **(Cunin ,1993)**

- Question de Recherche

Quel est l'effet de l'exposition aux rayons ultraviolets sur les bactéries et quel est le pourcentage d'élimination des cellules bactériennes ? Dans quelle mesure sont-ils efficaces pour provoquer des mutations de résistance aux antibiotiques et des mutations auxotrophes et de changement de taille ?

- Cette mémoire compose de 5 chapitres :

Le premier et deuxième chapitre contiennent des informations détaillées sur l'ADN et les mutations, en particulier sur les bactéries qui ont fait l'objet de recherches approfondies, à savoir *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*.

Le troisième chapitre est consacré aux dispositifs et outils utilisés dans le cadre de ces travaux.

Le chapitre quatre expliquera les résultats obtenus dans cette étude.

Dans le chapitre cinq, nos recherches seront discutées.

A la fin, une conclusion générale sera rédigée.

CHAPITRE I

Les Bactéries

I.1 Historique

Les Bactéries forment un monde immense. Ces êtres microscopiques, unicellulaires, paraissent souvent ubiquistes. Leurs modes de vie, très variés, vont de l'autotrophie au parasitisme. L'étude des Bactéries est fondamentale dans la connaissance des fermentations et celle des maladies. Les Bactéries interviennent dans des domaines très variés (genèse des pétroles, industries diverses telles que la synthèse des enzymes pour les lessives). Depuis quelques années, Certaines espèces bactériennes ont fait l'objet de recherches approfondies, spécialement en Génétique et en Biochimie.

C'est à la fin du XVIIe siècle, époque de l'invention des premiers microscopes, que paraît remonter la découverte des Bactéries. En 1683, Leuwenhoeck observe et dessine des Bactéries de la bouche, utilisant des appareils optiques qu'il construit lui - même. Pendant le XVIIIe siècle et jusqu'au début du XIXe, on croit à la génération spontanée. Ainsi, en 1745. Needham porte un bouillon de viande à l'ébullition, le laisse refroidir à l'air, et le voit fermenter. Des êtres nouveaux naîtraient au cours de la putréfaction.

En 1776, Spallanzani (1729-1799) réalise une expérience analogue, mais en bouchant le flacon après l'ébullition. Il constate que la fermentation ne se produit pas.

Les expériences rigoureuses de Pasteur (1822-1895) démontrent que la génération spontanée n'a pas lieu dans les conditions actuelles, mais que tout microorganisme dérive d'un microorganisme préexistant. La fermentation ne se déclenche pas dans un milieu nutritif qui a longuement bouilli dans une cornue prolongée par un bec long, étroit et sinueux. Elle se déclenche si l'on brise le col, ce qui permet aux germes aériens d'infecter le milieu.

Depuis les découvertes de Pasteur, de nombreuses espèces bactériennes ont été isolées et cultivées au laboratoire. **(Genevès,1979)**

I.2 Définition

Ce sont sans doute les êtres vivants les plus nombreux sur terre puisqu'on en dénombre actuellement plusieurs milliers d'espèces. La masse des bactéries est estimée de cinq à vingt - cinq fois supérieure à celle de tous les animaux, terrestres et marins réunis. Chaque bactérie est composée d'une seule cellule (protégée par une paroi) démontrent mesurant de 1 à 2 μm . L'unique chromosome bactérien est constitué d'une longue chaîne bicaténaire d'ADN circulaire. Les bactéries se multiplient en grossissant jusqu'à une taille maximale et en se divisant en deux. Ce processus est asexué, mais certaines bactéries effectuent une sorte de division sexuée primitive durant laquelle elles échangent du matériel génétique. **(Rolland ; Rolland, 1997)**

I.3 Croissance et reproduction

I.3.1 Division cellulaire

La plupart des bactéries « < ordinaires > », comme *E. coli*, se divisent par fission binaire en deux cellules sœurs identiques. D'autres bactéries, plus exotiques, se divisent selon un schéma plus complexe. Par exemple, *Caulobacter* se divise en deux cellules qui sont différentes en ce qui concerne la taille, la forme, les flagelles, et une structure en forme de tige. Certaines de ces bactéries se divisent, non pas par fission, mais par bourgeonnement de l'extrémité de la cellule, à la manière des levures. Il existe parmi les bactéries une assez grande diversité dans les détails du processus de division, et dans la forme cellulaire qui en découle ; c'est un fait qui contredit la notion, superficielle, que toutes les bactéries se ressemblent plus ou moins.

On rencontre, même parmi les bactéries qui se divisent par fission binaire, une importante diversité morphologique. Une extrême est représenté par *E. coli*, et les bactéries apparentées, chez lesquelles les cellules se séparent l'une de l'autre après la division, les cellules filles ne restant pas groupées d'une façon particulière. Par ailleurs, les Streptocoques, et certains membres du genre *Bacillus*, restent attachés après la division, formant des chaînes de cellules. D'autres bactéries, telle que la bactérie pourpre soufrée phototrophe appelée *Thiopedia*, se divisent selon un plan lors d'une division, et selon un plan perpendiculaire à la division suivante, formant ainsi des plaques rectangulaires. *Les Sarcina*, et certaines autres bactéries, alternent les divisions selon trois plans perpendiculaires ce qui aboutit à la formation de paquets de cellules de forme cubique. On

rencontre des schémas de division encore plus compliqués chez les procaryotes qui possèdent un cycle de développement complexe comme *les myxobactéries*, *les cyanobactéries*, et *les actinomycètes*. Certaines de ces bactéries supérieures ressemblent à des champignons ou des algues, du fait de la complexité des myxobactéries, *les cyanobactéries* morphologiques que peut prendre l'agencement de leurs cellules filles. (Neidhardt *et al.*, 1994)

I.3.2 Croissance et culture des bactéries

Les microbiologistes ont étudié les besoins nutritionnels des bactéries et ils ont mis au point des milieux pour les cultiver en laboratoire. (Pierce, 2012)

Plusieurs sortes de milieux artificiels sont utilisés pour la culture des Bactéries. Tous renferment de l'eau et un assortiment de sels minéraux (NH₄ CL, K₂HPO₄, MgSO₄, FeSO₄, CaCl₂), et, de plus, en très faibles quantités, des sels renfermant des oligoéléments (Mn, Mo, Cu, Co, Zn). Si l'on ajoute du glucose, le milieu permet la croissance de multiples microorganismes. Cependant, diverses Bactéries exigent aussi un ou plusieurs facteurs de croissance (acides aminés, vitamines, bases puriques ou pyrimidiques ...). (Genevès, 1979)

Un milieu qui ne contient que les éléments nécessaires aux besoins des bactéries prototrophes est un milieu minimum. Des souches mutantes ont une déficience en une ou plusieurs enzymes nécessaires à la métabolisation des nutriments ou à la synthèse de molécules essentielles et elles ne peuvent croître que sur un milieu auquel sont ajoutés un ou plusieurs suppléments nutritifs ; on les appelle *auxotrophes*. Par exemple, une souche auxotrophe incapable de synthétiser l'acide aminé leucine ne poussera pas sur un milieu minimum, mais bien sur un milieu auquel de la leucine a été ajoutée. Un milieu complet contient toutes les substances, y compris les acides aminés, nécessaires à la croissance et à la reproduction des bactéries. (Pierce, 2012)

Les milieux de culture sont liquides, ou solidifiés par l'addition de gélose (extraite de mucilages d'Algues rouges), ou de gélatine (provenant du collagène du tissu conjonctif des Animaux). Le milieu doit être généralement basique (un pH acide favorise la croissance des Champignons). (Genevès, 1979)

Les bactéries sont souvent cultivées dans des tubes à essai contenant un milieu liquide stérile. Quelques bactéries sont ajoutées au milieu, et elles croissent et se divisent jusqu'à ce que les nutriments soient épuisés ou – plus communément – jusqu'à ce que la concentration

de leurs déchets devienne toxique. Les bactéries peuvent aussi être cultivées sur des boîtes de Petri. Une suspension d'agar dans le milieu de croissance est coulée dans la partie inférieure d'une boîte de Petri et, en se solidifiant, elle forme un gel sur lequel peuvent croître les bactéries. Par un procédé appelé étalement, une suspension diluée de bactérie est étalée à la surface du gel d'agar contenu dans une boîte de pétri.

Les bactéries individuelles croissent et se divisent pour former des amas visibles de cellules génétiquement identiques (des colonies). (Pierce,2012)

I.4 Structure cellulaire

Les bactéries sont des cellules particulièrement robustes : elles sont difficiles à casser par des moyens mécaniques, et elles gardent leur forme même dans des conditions rigoureuses. Une grande partie de cette robustesse est due à leur paroi cellulaire qui fournit un support mécaniquement rigide et s'oppose à la pression qui ferait autrement exploser la cellule (la lyse osmotique). La paroi cellulaire représente, de plus, un moyen de défense chimique et physique contre des composés nocifs qui pourraient endommager la membrane cellulaire. Il y a une différence la structure des parois des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et dans le rôle que joue cette structure dans l'adaptation aux changements du milieu. Toute portion de la paroi d'une bactérie à Gram positif ressemble à un épais manteau, celle de la plupart des bactéries à Gram négatif n'étant qu'une pauvre chemise. En réalité, même la fine paroi des Gram négatifs possède une considérable force de tension.

La paroi des bactéries à Gram positif La paroi des bactéries à Gram positif consiste en une épaisse couche multimoléculaire de muréine (un type de peptidoglycane) associée à des quantités moindres d'autres polymères dispersés, en particulier des acides téichoïques. Cette étoffe de polymères enveloppe de nombreuses fois la cellule sur la totalité de sa longueur et de sa largeur, formant ainsi une sorte de sac qui détermine la taille et la forme de l'organisme. La muréine peut être isolée intacte sous la forme de structures appelées saccules. La forme de la bactérie dépend de celle du saccule : la plupart des bactéries ressemblent à des bâtonnets (les bacilles), à des sphères (les coques ou Cocci), ou à des hélices (les spirilles et les spirochètes) ; quelques – unes ressemblent à des fuseaux, des étoiles de mer, ou des polyèdres aplatis ; d'autres encore revêtent des formes différenciées plus complexes.

Les bactéries à Gram négatif ont élaboré une solution radicalement différente au problème de la protection de la membrane cytoplasmique. Leur couche de muréine est beaucoup plus fine que celle des bactéries à Gram positif, et elles fabriquent une structure

complètement muréine. La membrane externe a une composition chimique distincte de celle des membranes biologiques habituelles, et elle a la capacité de résister à des produits corrosifs. Sa structure est une double couche dont le feuillet interne a une composition ressemblant à celle de la membrane cytoplasmique. Son feuillet externe, par contre, possède un constituant particulier à la place des phospholipides. Ce composé est le lipopolysaccharide bactérien, ou LPS, une molécule complexe qu'on ne trouve pas ailleurs dans la nature. Le résultat est que les feuillets de cette membrane sont extrêmement asymétriques, et que les propriétés de cette double couche inhabituelle diffèrent considérablement de celles d'une membrane biologique normale. Sa capacité à exclure des composés hydrophobes ne s'observe généralement pas pour les autres membranes biologiques. (Neidhardt *et al.*, 1994)

I.5 Morphologie et association des bactéries

Bactéries peuvent avoir plusieurs formes : cylindrique (bacille), sphérique (coque), en forme de virgule (vibrion), ou de S (spirille). Plus rarement, elles ont la forme d'un citron, d'une poire ou même d'un carré. A la fin des années 70, un groupe de bactéries jusque-là inconnu a été découvert : les archéobactéries *. Elles diffèrent des bactéries classiques, les eubactéries, par leur structure biochimique et leur génome, qui indique qu'elles sont représentatives d'un groupe très ancien de bactéries. Elles se développent dans des milieux extrêmes - lacs saturés en sel, volcans sulfureux, sédiments dépourvus d'oxygène ou dans l'intestin des animaux et des hommes. Dans ce dernier cas, on les connaissait sans percevoir leur véritable nature. (Rolland ; Rolland, 1997)

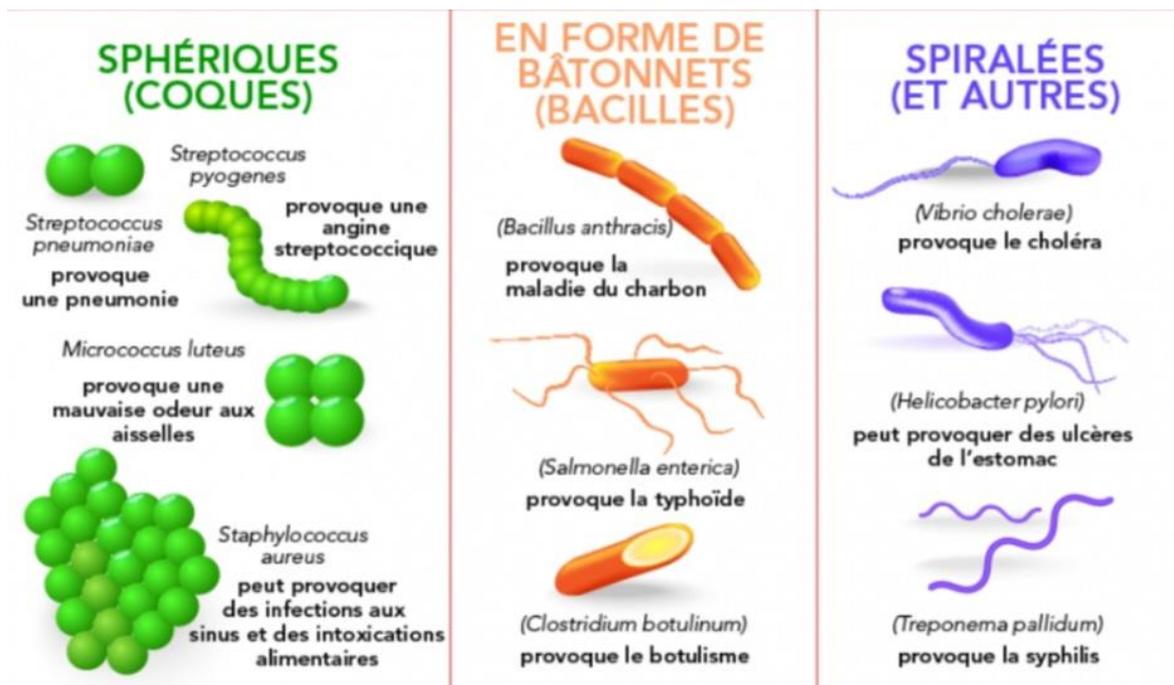


Figure 1 : Formes des bactéries. (Bailey, 2019)

I.6 Génétique

La seule fonction que nous connaissons au génome bactérien est d'être le dépositaire répliatif des informations codées par la séquence des bases de son ADN. De ce point de vue, le génome des bactéries est semblable à celui de toutes les autres cellules. Pourtant, sous bien d'autres aspects, il en diffère profondément. Nous avons déjà noté quelques différences dans son architecture moléculaire. Il y a dans le génome bactérien d'autres aspects qui sont uniques :

- L'absence d'un complément (diploïde) de chaque gène ;
- L'utilisation presque entière du génome pour le codage ou la régulation, et l'absence de séquences d'ADN redondantes ;
- L'absence dans le chromosome d'histones, les protéines des chromosomes eucaryotes ;
- La tendance qu'ont les gènes bactériens codant des fonctions apparentées à être liés les uns aux autres en des unités de transcription multicistroniques dénommées opérons ;
- La colinéarité entre les gènes bactériens et leur produit protéique (c'est - à - dire l'absence d'introns dans les gènes bactériens).

D'autres caractéristiques de génome procaryote méritent d'être notées ici, même si elles ne sont pas uniques :

- L'existence, à côté de l'unique chromosome, d'unités génétiques accessoires, les plasmides ;
- Le fait que l'un et l'autre brin comportent des séquences codantes avec une fréquence à peu près égale. (Neidhardt *et al.*, 1994)

I.7 Mobilité des bactéries

Filaments

C'est un filament hélicoïdal qui est mis en mouvement par un moteur situé à sa base et qui tourne par rapport à la surface bactérienne, de sorte que la cellule est propulsée à travers le milieu. Les flagelles bactériens transmettent le mouvement uniquement par rotation ; ils ne se courbent pas comme dans le cas des flagelles eucaryotes (de ce fait, pour les bactéries, le terme de « flagelle, qui vient de flagellum, le fouet, est impropre »). Les flagelles sont, en biologie, un des rares exemples d'axe en rotation. Leur présence peut conduire à conclure que la roue existe effectivement dans le monde biologique.

Toutes les bactéries ne sont pas mobiles, et certaines bactéries mobiles ne possèdent pas de flagelles. Il existe d'autres types de motilité, comme chez certaines bactéries qui se déplacent par glissades. Les bactéries flagellées peuvent être distinguées par le nombre et la position de ces organites. Certaines espèces, comme les membres du genre *Pseudomonas*, ne possède qu'un seul flagelle polaire. *Escherichia coli* possède une dizaine de flagelles et *Proteus*, qui lui est apparenté, plusieurs centaines. Dans ces espèces, les flagelles sont implantés sur toute la surface ; de telles cellules sont appelées péritriches (« avec des poils partout »).

Chaque flagelle est composé de trois parties de complexités moléculaires différentes. La partie la plus externe est formée du long filament hélicoïdal, qui s'étend dans le milieu sur 5 à 10 μm , soit plusieurs fois la longueur de la cellule. Le filament est relié • par le crochet au corps basal, une structure complexe qui ancre le flagelle dans l'enveloppe cellulaire et lui sert de moteur pour sa rotation. (Neidhardt *et al.*, 1994)



Figure 2 : les flagelles et les fimbriae (Willey J.M *et al.*,2018)

I.8 Interaction avec d'autre organismes :

Malgré leur apparente simplicité, les bactéries peuvent former des associations complexes avec d'autres organismes. Ces associations symbiotiques peuvent être divisées en parasitisme, mutualisme et commensalisme. Pour la raison que leur petite taille, les bactéries commensales sont omniprésentes et se développent clairement sur les animaux et les plantes comme elles se développeront sur n'importe quelle autre surface. Néanmoins, leur croissance peut être augmentée par la chaleur et la sueur, et de grandes populations de ces organismes chez l'homme sont à l'origine des odeurs corporelles. (Vanilssen, 2020)

I.9 Classification et Identification des bactéries

L'identification des bactéries en laboratoire est particulièrement pertinente en médecine, où le traitement correct est déterminé par l'espèce bactérienne à l'origine d'une infection. Par conséquent, le besoin d'identification a été une impulsion majeure pour le développement de techniques pour trouver des bactéries.

La classification cherche à décrire la diversité des espèces bactériennes en nommant et en regroupant les organismes en fonction de similitudes. Bacteria peut être classé sur la base de la structure cellulaire, du métabolisme cellulaire ou des différences dans les composants cellulaires, par exemple DNA, acides gras, pigments, antigènes et quinones. D'un autre côté,

ces schémas permettaient l'identification et la classification des souches bactériennes, il n'était pas clair si ces différences représentaient une variation entre espèces inégales ou entre souches de la même espèce. (Vanilssen., 2020)

I.9.1 Historique du classement

En 1872, Ferdinand Cohn démontra que les bactéries pouvaient être divisées en genres et espèces en utilisant le paradigme proposé pour les plantes et les animaux par le père de la taxonomie moderne, Carl Linnaeus.

À la fin du XIXe siècle, la physiologie bactérienne commence à avoir un impact sur la taxonomie, mais les systématiciens emploient encore une technique typiquement « botanique » pour nommer de nouvelles espèces ; ils ont d'abord classé les bactéries selon leur morphologie. Entre 1955 et les années 1980, les taxonomistes bactériens ont développé de nombreuses nouvelles techniques pour analyser le monde bactérien. La chimiotaxonomie, dans laquelle les structures chimiques des constituants cellulaires sont utilisées pour différencier les bactéries en groupes apparentés, a été intégrée aux descriptions des espèces.

En 1961, McCarthy et Bolton ont présenté un moyen de comparer le matériel génétique par hybridation ADN-ADN, une méthode sur laquelle les systématistes bactériens s'appuient encore aujourd'hui pour établir des distinctions entre des espèces étroitement apparentées. L'analyse phénotypique numérique a également émergé au cours de cette période, suivie par l'analyse plus sophistiquée des séquences protéiques.

En 2000, Hagström et al. ont rapporté leur comparaison des similitudes des séquences d'ARNr 16S avec les valeurs de réassociation ADN-ADN. Ils ont affirmé qu'une identité de séquence d'ARNr 16S de 97 % ou moins entre deux bactéries était suffisamment différente pour caractériser ces bactéries comme des espèces différentes. Plus tard, cette valeur a été augmentée à 99 % d'identité de séquence à la lumière de nouvelles données. (ncbi.nlm.nih.gov, 2024)

I.9.2 Chimio taxonomie

La chimiotaxonomie est définie comme : la caractérisation complète faite à partir des similitudes et des différences des propriétés biochimiques des bactéries. La chimiotaxonomie examine la distribution des macromolécules biologiques et chimiques contenant ; acides aminés, peptides, lipides, polysaccharides et autres polymères, protéines, enzymes apparentés ainsi que d'autres molécules polymères complexes telles que la quinone

isoprénoïde et le stérol parmi les membres de différents taxons. Ensuite, il utilise ces informations à des fins de classification et d'identification.

(Gokdemir ; ARAS, 2019)

I.9.3 Classification génotypique

L'ère de la classification basée sur le génome des bactéries (et des archées) trouve son origine dans les travaux de Woese et al. [118, 119]. Dans une analyse phylogénétique basée sur la caractérisation de séquences d'ARN ribosomal (ARNr), les auteurs ont pu montrer que les relations phylogénétiques des bactéries pouvaient être déterminées en comparant une partie stable du code génétique. En tant que candidats pour ce domaine génétique chez les bactéries, ils ont identifié des gènes codant pour les petites sous-unités ribosomales 5S, 16S et 23S ARNr. De plus, sur la base de ces études antérieures, Woese et al. [120] ont proposé un système naturel pour classer les bactéries, les archées et les eucaryotes, basé sur des comparaisons des séquences génétiques de la petite sous-unité ribosomale. Dans les années qui ont suivi, cette méthode est devenue une norme pour l'identification des bactéries et des archées. (Gottlieb Land, 2023)

I.9.4 Classification actuelle

L'utilisation des séquences des gènes d'ARNr, tout particulièrement celles de l'ADNr 16S, est à l'origine d'un des plus grands bouleversements survenus dans l'histoire de la microbiologie.

La classification phylogénétique basée sur l'ARNr 16S est présentée dans la nouvelle édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Les procaryotes sont alors divisés en deux domaines Archaea et Bacteria. Les niveaux de hiérarchisation restent les mêmes que pour la classification phénotypique excepté pour le niveau le plus élevé qui est le phylum. (Garrity *et al.*, 2001)

I.10 La bactérie : *Klebsiella pneumoniae*

Les *Klebsiella* sont des saprophytes du tube digestif et des voies aériennes supérieures qui peuvent être également rencontrées dans la nature.

Le biotype le plus souvent rencontré est *Klebsiella pneumoniae* encore appelé *Pneumobacille* de Fueo-lander. Ce sont des bacilles immobiles, souvent encapsulés qui vont fermenter la plupart des hydrates de carbone avec production abondante de gaz. (Seck, 2001)

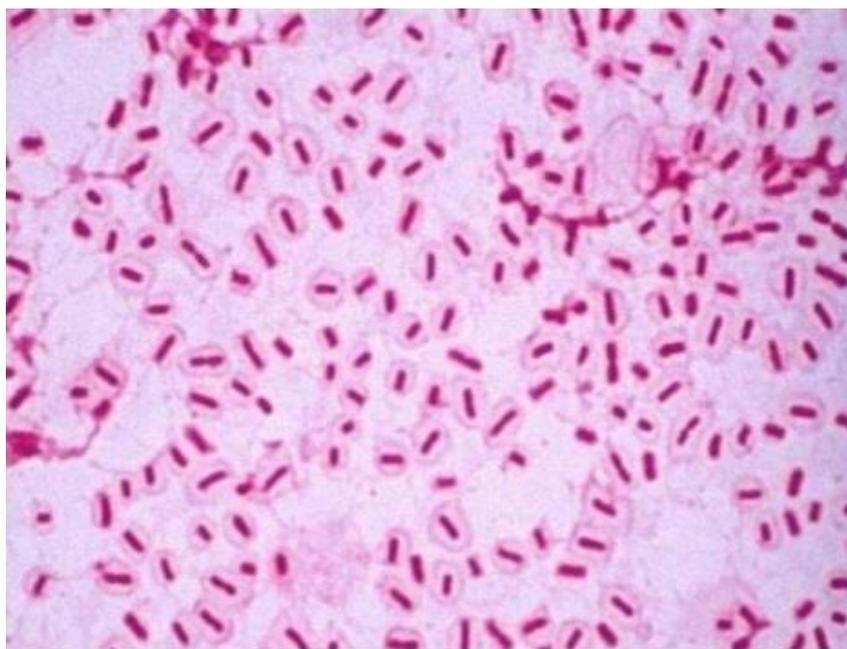


Figure 3 : Coloration de Gram de *Klebsiella pneumoniae*. (Gueye, 2017)

I.10.1 Habitat

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire, et fréquemment isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux, et de muqueuses des Mammifères, en particulier de la flore fécale. Chez l'homme, cette espèce végète sur la peau, les Muqueuses, les voies respiratoires supérieures et elle est isolée des selles chez 30 % des individus. Pour ce qui est des infections nosocomiales, le tube digestif des patients hospitalisés et les mains du personnel sont les deux sources principales. Les deux sous-espèces *K. Pneumonie Subsp. Ozaenae* et *K. Pneumoniae subsp. Rhinoscleromatis* n'ont été isolées qu'en situation Pathogène de l'arbre respiratoire de l'homme. (Baerwolf *et al.*, 2002)

I.10.2 Taxonomie

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19ème siècle. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, connue autre fois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie. (Ferney *et al.*, 2000)

Règne : Bactéria

Embranchement : Protéobactéria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* (*Klebsielles*) comporte cinq espèces dont l'espèce type est *K.p*. L'espèce *K.p* est subdivisée en 3 sous espèces : *K. pneumoniae subsp pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp ozaenae* et *K. pneumoniae subsp Rhinoscleromatis*. (Avril *et al.*,2000)

I.10.3 Caractéristiques bactériologiques

I.10.3.1 Caractères morphologiques

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, diplobacilles généralement capsulées, non sporulées, anaérobies facultatifs. (El Fertas-Aissani *et al.*,2012)

I.10.3.2 Caractères cultureux

K. pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose. Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactérie (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, EMB) après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37 °C, les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, ronde, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine. En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37 °C pour *K. p* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90% des souches de *K. pneumoniae* croissent à 44 °C en bouillon lactose bilié vert brillant et plus de 80% en fermentant le lactose avec production de gaz. (Le Minor ; Véron,1989)

I.10.3.3 Les Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité :

□Antigènes « O » somatiques : la recherche des antigènes « O » présente peu d'intérêt pratique, en raison de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires

□ Antigènes « K » capsulaires : au moi 77 antigènes K ont été décrites chez *K. pneumoniae*, K1 à K72, K74, K79 à K82. Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent aux types capsulaires 1 et 2, plus rarement 3 et 4.

□ Antigène d'adhérence : appelé fimbriae, de nature protéique, porté par des pili communs. (Le Minor ; Véron,1989)

I.10.3.4 Caractères biochimiques

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, Catalase positive, possède une nitrate-réductase.

K. pneumoniae est : VP+, LDC+, ODC-, IND-, Citrate+, Urée+, ONPG+, H₂S-, TDA-, réduction des nitrates en nitrites (NO₃+). (Le Minor ; Véron,1989)

I.11 La bactérie : *Staphylococcus aureus*

S.aureus est un coque à coloration de Gram positive. Il mesure de 0,5 à 1 µm de diamètre, ne sporule pas, est immobile, aéro-anaérobie facultatif et possède une catalase et une coagulase. *S.aureus*, espèce type du genre *Staphylococcus*, parfois appelée staphylocoque doré, produit de nombreuses toxines dont les SE, produites par certains *S.aureus* (ceux portant les gènes de ces toxines) et qui sont responsables d'épidémies liées à cette bactérie. (De Buyser ; Sutra,2005)

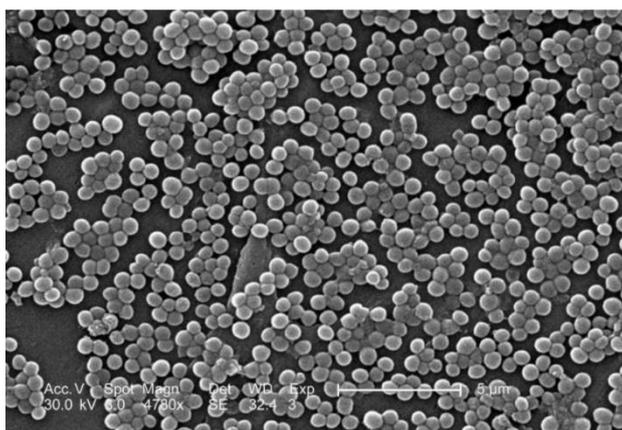


Figure 4 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique x4780. (phil.cdc.gov, 2022)

I.11.1 Habitat

Réservoirs de *S. aureus* chez les hôtes humains et animaux *S. aureus* appartient à la flore commensale normale des animaux à sang chaud, principalement les mammifères (terrestres

et marins), mais aussi les oiseaux. À la différence d'autres espèces de *staphylocoques* qui ont un hôte préférentiel, *S. aureus* semble capable de coloniser tous les mammifères.

S. aureus colonise la surface et les glandes de la peau, ainsi que les a muqueuses de ses hôtes. Chez l'homme, il est principalement présent au niveau du tractus respiratoire supérieur, en particulier dans les fosses nasales,

Mais aussi au niveau du cuir chevelu et des mains.

Dans la bouche, il coloniserait préférentiellement la surface des dents.

Chez les vaches, il serait localisé principalement au niveau du mufle et de la peau des trayons. **(Le Loir ; Gautier,2009)**

I.11.2 Taxonomie

Du point de vue taxonomique, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif), à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Bacillales*. Outre les *Staphylococcus sp.*, la famille bactérienne des *Staphylococ- caceae* comprend quatre autres genres moins connus, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*. Les espèces phylogénétiquement proches les plus connues sont les membres du genre *Bacillus* dans la famille des *Bacillaceae*, qui sont au même niveau que la famille des *Staphylococcaceae*. Les *Listeriaceae* composent aussi une famille proche.

Jusqu'à récemment (fin des années 1990), le genre *Staphylococcus* était classé au sein du groupe des *Micrococcaceae* avec notamment les genres *Micrococcus* et *Stomatococcus*. Les membres du genre *Staphylococcus* diffèrent cependant de ceux du genre *Micrococcus* entre autres par leur métabolisme anaérobie facultative, par un contenu en G + C compris entre 30 et 39 % (contre 63 à 73 % pour *Micrococcus*), par leur paroi contenant un peptidoglycane et des acides teichoïques et par la présence de peptide oligoglycine dans les ponts peptidiques de la paroi. Les études génétiques ont permis de reclasser *Micrococcus* au sein du groupe des actinomycètes. **(Le Loir ; Gautier,2007)**

I.11.3 Bactériologie de *Staphylococcus aureus*

I.11.3.1 Caractères morphologiques

Les *staphylocoques* sont des coques immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas plan de plusieurs éléments (du grec *staphylo*, grappe de raisin), diamètre moyen 0,8 à 1 µm. Après coloration de Gram, ce sont des Cocci Gram positif. La

grande majorité des souches de *S. aureus* sont capsulées, mais les souches peuvent perdre leur capsule après culture (**Le Loir ; Gautier,2007**)

I.11.3.2 Caractères cultureux

Certaines espèces de *staphylocoques* sont capables de croître dans des conditions hostiles (par exemple en bouillon hypersalé à 7 % de Na Cl). Ce caractère est parfois mis à profit (surtout en bactériologie alimentaire), dans l'utilisation de milieux sélectifs (milieu de Chapman) pour les isoler. *S. aureus* présente une bonne croissance sur milieux usuels en 18-24 h à 37 ° C (culture entre 10 et 45 ° C). Sur gélose ordinaire, les colonies de *S. aureus* sont lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune - orange, pour *Staphylococcus aureus*). En gélose profonde, la croissance est observée sur toute la hauteur du tube signant le caractère aéro - anaérobie facultatif. Une seule sous - espèce est anaérobie stricte (*S. aureus subsp. anaerobius*). En bouillon, la culture de *S. aureus* forme un trouble uniforme abondant, parfois un dépôt et un voile en surface. (**Le Loir ; Gautier,2007**)

I.11.3.3 Caractères biochimiques

De nombreuses études ont permis de dresser des profils métaboliques pour la plupart des espèces de staphylocoques. Les principaux caractères biochimiques pris en compte sont la production de catalase, la capacité à métaboliser les sucres et la production d'arginine dihydrolase (ADH). Le tableau 2 récapitule la plupart de ces caractéristiques pour *S. aureus* et les autres espèces de staphylocoques à coagulase positive. (**Le Loir ; Gautier,2007**)

CHAPITRE II

ADN et Mutagenèse

II.1 ADN

II.1.1 Définition de l'ADN

La structure de l'ADN suggère la façon dont cette molécule sert de support informationnel et dont ces informations peuvent être transmises aux générations suivantes. La molécule d'ADN est composée d'une succession d'unités de structure, appelées des nucléotides, qui sont constituées chimiquement des éléments suivants :

- du phosphate :

-un sucre, le désoxyribose ;

- lié à une base azotée : soit l'adénine ou A, soit la guanine ou G, soit la cytosine ou C, soit la thymine ou T.

La double hélice, la structure tridimensionnelle imaginée par J. Watson et F. Crick, est constituée de 2 chaînes (ou brins) entrelacées de nucléotides placés côte - à - côte. Les 2 brins nucléotidiques sont maintenus ensemble par des liaisons hydrogène entre les bases de chaque brin : les 2 bases appariées ainsi formées constituent une paire de bases. La succession des nucléotides le long de chaque brin est formée par les liaisons phosphodiester entre l'atome de carbone 5 ' d'un désoxyribose et l'atome de carbone 3 ' du désoxyribose adjacent. Pour cette raison, le squelette sucre - phosphate a un sens : 5'→ 3'. Les deux squelettes correspondant aux deux brins nucléotidiques de la double hélice ont une orientation opposée, dite antiparallèle. (Vincent,2007)

II.1.2 Acides nucléiques : Les molécules clés de l'information génétique

Les acides nucléiques sont des molécules constituées d'un enchaînement linéaire de nucléotides. On distingue deux types d'acides nucléiques :

- l'acide désoxyribonucléique (ADN) ;
- et l'acide ribonucléique (ARN).

Ces deux molécules se distinguent par la nature de leur pentose : le ribose pour l'ARN et le désoxyribose pour l'ADN. Cette différence de structure est à l'origine de leur nom. Une autre différence entre ADN et ARN réside dans la nature de leurs bases. La fonction des molécules d'ADN et d'ARN dans une cellule eucaryote est bien différente :

- l'ADN contient l'ensemble de l'information génétique nécessaire à la structure et au fonctionnement de la cellule et de l'organisme ;
- les ARN sont des molécules, qui transféreront cette information génétique et participeront à la machinerie cellulaire pour la fabrication de toutes les protéines. **(Etienne *et al.*,2006)**

II.1.3 Le rôle d'ADN

Dans le noyau cellulaire, l'ADN se trouve sous forme de chromosome ou de chromatine selon la phase dans laquelle se trouve le processus de division cellulaire. La régulation de ces deux structures est réalisée par les protéines appelées histones.

Cette macromolécule est sans doute la plus importante étant donné les différents rôles importants qu'elle remplit dans les systèmes vivants : stockage de l'information génétique, synthèse des protéines, contrôle de la multiplication cellulaire. **(Despax, 2014)**

II.1.4 Importance de l'ADN dans la compréhension de la vie et de la génétique

À partir du moment où les biologistes ont considéré l'ADN comme matériel génétique, on s'attendait à ce qu'il remplisse trois fonctions principales :

1. Stockage de l'information génétique. Pour servir de matériel génétique, l'ADN doit contenir un enregistrement des instructions déterminant toutes les caractéristiques héréditaires de l'organisme. En termes moléculaires, l'ADN doit contenir l'information relative à l'ordre spécifique des acides aminés de toutes les protéines synthétisées par l'organisme.

2. Autoréplication et hérédité. L'ADN doit contenir l'information nécessaire à sa propre réplication (duplication). La réplication de l'ADN permet la transmission des instructions génétiques d'une cellule aux cellules qui en dérivent et d'un individu à sa descendance.

3. Expression du message génétique. L'ADN n'est pas seulement un centre de stockage ; il dirige aussi l'activité de la cellule. Par conséquent, l'information codée dans l'ADN doit s'exprimer en participant aux activités de la cellule. Plus précisément, l'information de l'ADN doit servir à diriger l'ordre d'incorporation des acides aminés spécifiques à une chaîne polypeptidique. (Karp, 2004)

II.1.5 Structure de l'ADN

II.1.5.1 Découverte de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick

Les expériences identifiant le matériel génétique ont ouvert la voie à une des avancées les plus importantes de l'histoire de la biologie - la découverte de la structure tridimensionnelle de l'ADN par James Watson et Francis Crick en 1953. Auparavant, l'essentiel de la chimie de l'ADN avait déjà été déterminé par Miescher, Kossel, Levene, Chargaff, et d'autres. On savait que l'ADN est un polymère constitué de nucléotides, et que chaque nucléotide contient un sucre, une base, et un groupement phosphate. Cependant, l'arrangement précis des nucléotides dans la structure tridimensionnelle de la molécule restait une énigme. En 1947, William Ashbury commença d'étudier la structure tridimensionnelle de l'ADN en utilisant une technique appelée diffraction des rayons X, dans laquelle un faisceau de rayons X envoyé sur une molécule est diffracté par les atomes de la molécule selon un schéma caractéristique qui reflète l'arrangement spatial des atomes. Toutefois, ses images de diffraction n'atteignaient pas une résolution suffisante pour révéler la structure. Un groupe de recherche dirigé par Maurice Wilkins et Rosalind Franklin au King's College de Londres utilisait également la diffraction des rayons X pour étudier l'ADN, et il obtint de bien meilleures images. Cependant, Wilkins et Franklin n'arrivèrent pas à développer une structure complète de la molécule ; l'avancement de leurs travaux fut retardé en partie par la mésentente qui existait entre eux.

Watson et Crick s'attaquèrent à la structure de l'ADN, non par la collecte de nouvelles données mais en utilisant toute l'information disponible sur la chimie de l'ADN pour construire des modèles moléculaires. En appliquant les lois de la chimie structurale, ils purent limiter le nombre possible de structures que pourrait prendre l'ADN. Ils testèrent différentes structures en construisant des modèles faits de fils et de plaques de métal. Grâce

à leurs modèles, ils pouvaient voir si une structure était compatible avec les principes chimiques et avec les images aux rayons X. (Pierce,2012)

II.1.5.2 Décoder le puzzle de l'ADN : la révélation de la double hélice

De Watson et Crick

D'après les résultats de diffraction aux rayons X et les résultats obtenus par l'étude de l'ADN de plusieurs organismes, une règle d'appariement des bases fut établie : chaque paire de bases est constituée d'une purine et d'une pyrimidine, la paire G - C et la paire A - T. La paire G - C possède 3 liaisons hydrogène alors que la paire A - T en possède deux. La liaison G - C est donc plus stable que la liaison A- T. L'appariement des bases A et T, et G avec C est dit complémentaire ; les 2 brins nucléotidiques d'une molécule d'ADN sont donc dits brins complémentaires. Les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes qui maintiennent la structure en double hélice sont des liaisons faibles : une température élevée (100 ° C) et un milieu très alcalin (pH élevé) sont suffisants pour séparer les 2 brins, on parle de dénaturation de l'ADN. Ce processus est réversible.

Cette structure tridimensionnelle particulière de la molécule d'ADN, établie sous le modèle de la double hélice, pouvait remplir les 3 exigences qui avaient été formulées préalablement par les généticiens pour être considérée comme le matériel héréditaire :

- 1.l'appariement spécifique des bases nucléotidiques suggère un mécanisme possible de copier du matériel génétique.
2. il peut être envisagé que la séquence des paires de bases puisse dicter une séquence d'acides aminés de la protéine spécifiée par ce gène.
3. si la séquence des bases de l'ADN spécifie la séquence d'acides aminés, une mutation est envisageable par la substitution (le remplacement) d'un type de base par un autre. (Vincent,2007)

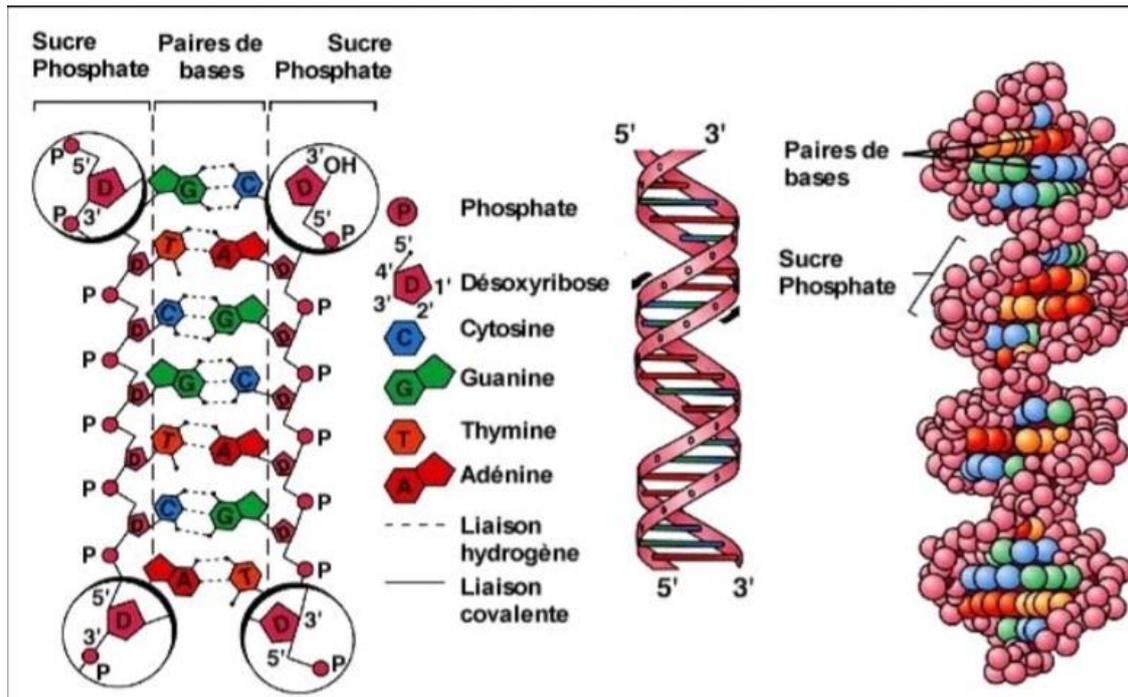


Figure 5 : Structure d'ADN. (tp-svt.pagesperso-orange.fr, 2023)

II.1.5.3 La composition chimique et la structure des acides nucléiques

Sous la direction de Hoppe - Seyler, Miescher s'intéressa à la chimie du pus, une sécrétion importante d'un point de vue médical. Le pus contient des leucocytes (globules blancs) contenant de très grands noyaux. Miescher montra que le noyau contient une substance nouvelle, légèrement acide et riche en phosphore. Ce matériel était de l'ADN associé à des protéines.

En 1887, les chercheurs étaient arrivés à la conclusion que la base physique de l'hérédité était localisée dans le noyau. On établit que la chromatine était faite d'acide nucléique et de protéine, sans que l'on pût préciser laquelle de ces substances était l'information génétique. A la fin du XIXème siècle, Albrecht Kossel détermina que l'ADN contient quatre bases azotées : adénine, cytosine, guanine, et thymine (en abrégé, A, C, G, et T). Phoebus Aaron Levene montra ensuite que l'ADN est constitué d'une répétition d'unités liées appelées nucléotides ; chaque nucléotide contient un sucre, un phosphate et une base.

Les sucres de l'ADN et de l'ARN ont une structure légèrement différente. Le sucre de l'ARN, le ribose, a un groupe hydroxyle (-OH) attaché à l'atome de carbone 2', tandis que le sucre de l'ADN, le désoxyribose, a un atome d'hydrogène (-H) à cette position et contient donc un atome d'oxygène de moins. Cette différence donne leur nom aux acides nucléiques : acide ribonucléique (ARN) et acide désoxyribonucléique (ADN).

Le deuxième composant d'un nucléotide est sa base azotée, qui peut être de deux types : une purine ou une pyrimidine. Chaque purine est faite d'un cycle à six atomes attachés à un cycle à cinq atomes, tandis que chaque pyrimidine ne contient qu'un cycle à six atomes. L'ADN et l'ARN contiennent deux purines, l'adénine et la guanine (A et G) qui diffèrent par la position de leurs doubles liaisons et par les groupes ou les atomes attachés au cycle à six atomes. On trouve trois pyrimidines dans les acides nucléiques : la cytosine (C), la thymine (T), et l'uracile (U). La cytosine est présente dans l'ADN et l'ARN, la thymine ne se trouve que dans l'ADN, et l'uracile ne se trouve que dans l'ARN.

Le troisième composant d'un nucléotide est le groupement phosphate qui consiste en un atome de phosphore lié à quatre atomes d'oxygène. (Pierce,2012)

II.1.6 Organisation de l'ADN dans les chromosomes

Taille de la cellule : par exemple, la cellule bactérienne *Escherichia coli*. L'emballage de l'ADN au sein de la structure chromosomique est un phénomène très important lié aux contraintes physiques imposées par la cellule. La cellule bactérienne qui fait 0,5 à 1 µm de longueur doit contenir un génome d'1,5 mm de long ; une cellule humaine contient près de 2 m d'ADN nucléaire ! En fait, le chromosome constitue une superstructure avec plusieurs niveaux (ou ordres) successifs d'enroulement et donc de compaction de l'ADN. A un premier niveau de compaction, l'ADN enroulé autour de protéines chromosomiques appelées des histones forment des structures appelées nucléosomes : chaque nucléosome est composé d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule 2 fois la molécule d'ADN. Ceux-ci, dans des conditions salines, se rapprochent et s'organisent selon un solénoïde, constituant ainsi un degré d'enroulement supérieur. Un niveau encore supérieur est encore requis pour aboutir à la superstructure chromosomique : le solénoïde forme des boucles qui se fixent à une armature centrale protéique via des sites de fixation sur l'ADN, appelés des SAR (Scaffold Attachment Regions) ; puis, l'armature et les boucles s'organisent en un superenroulement. (Vincent,2007)

II.1.7 Structure et diversité des chromosomes chez les bactéries

La plupart des génomes bactériens sont constitués d'une seule molécule circulaire d'ADN, bien que des molécules linéaires d'ADN aient été trouvées chez certaines espèces. Dans les chromosomes circulaires des bactéries, l'ADN ne peut exister sous la forme d'un cercle ouvert relâché (ne serait-ce que parce qu'il n'a pas d'extrémités libres). Les 3 à 4 millions de paires de bases d'ADN d'un génome bactérien type ne pourraient, à l'état relâché,

être emmagasinées dans une cellule bactérienne. L'ADN bactérien n'est pas associé à des protéines histones comme l'ADN des eucaryotes, mais il est associé en complexe avec plusieurs protéines qui contribuent à le rendre compact. Quand une cellule bactérienne est observée au microscope électronique, son ADN a l'aspect d'une pelote emmêlée, le nucléoïde, qui occupe une partie du cytoplasme. Quand une cellule bactérienne est ouverte par lyse ménagée, son ADN sort et s'étend en boucles entortillées. Les boucles sont fermées à leur base par des protéines. La plupart des bactéries contiennent de l'ADN supplémentaire sous la forme de petites molécules circulaires appelées plasmides, qui se répliquent indépendamment du chromosome. (Pierce,2012)

II.1.8 Réplication de l'ADN

II.1.8.1 Processus de la réplication de l'ADN

L'analyse du processus de réplication qui va suivre se fonde en grande partie sur les systèmes bactériens où la réplication a été étudiée très en détail et où elle est la mieux comprise. Bien que plusieurs aspects de la réplication chez les eucaryotes soient similaires à ceux observés chez les procaryotes, il y a des différences importantes.

L'initiation Le chromosome d'*Escherichia coli* contient une seule origine de réplication (oriC). La séquence minimum nécessaire au fonctionnement d'oriC est de 245 pb et elle contient plusieurs sites essentiels. Une protéine d'initiation (DnaA chez *E. coli*) se lie à oriC et provoque le déroulement d'un court segment d'ADN, ce qui permet l'attachement d'une hélicase et d'autres protéines qui lient l'ADN simple brin.

La séparation des brins et le déroulement de l'ADN La synthèse d'ADN nécessite une matrice d'ADN simple brin. Il faut donc que l'ADN double brin soit déroulé et la cellule dispose pour ce faire de plusieurs protéines et enzymes.

L'élongation des chaînes nucléotidiques Une fois l'ADN déroulé et les amorces synthétisées, des ADN polymérases allongent les chaînes d'ADN en catalysant la polymérisation des nucléotides.

La terminaison La réplication de certaines molécules d'ADN se termine quand deux fourches de réplication se rencontrent. D'autres molécules d'ADN contiennent des sites où des séquences de terminaison arrêtent le processus de réplication.

La fidélité de la réplication Le taux global d'erreurs de réplication chez les bactéries est de moins d'une par milliard de nucléotides ($1 / 10^9$), soit une par 1 000 bactéries et par

génération. Les ADN polymérase ont une grande capacité de discrimination en ce qui concerne la complémentarité des nucléotides qu'elles appariement. Les erreurs de sélection de nucléotides se produisent une fois sur 100 000 ($1/10^5$). La plupart des erreurs de sélection de nucléotides sont corrigées par un mécanisme dit de relecture ou de correction d'épreuve (« proofreading » en anglais). Quand une ADN polymérase insère un nucléotide incorrect dans le brin en cours de synthèse, le groupe 3' – OH du nucléotide mal apparié ne se trouve pas à la bonne position dans le site actif de l'ADN polymérase pour accepter le nucléotide suivant. Le positionnement incorrect stoppe la réaction de polymérisation, et l'activité exonucléase de 3' vers 5' de l'ADN polymérase excise le nucléotide mal apparié. L'ADN polymérase peut alors insérer le nucléotide correct.

Un troisième processus, appelé réparation des défauts d'appariement, corrige les erreurs une fois que la répllication est terminée. **(Pierce,2012)**

II.1.9 Rôle des enzymes dans la réplication

Tableau 1 : les éléments indispensables du système de réplication chez les bactéries (Pierce,2012)

Composant	Fonction
Protéines d'initiation	Se lient à proximité de l'origine et séparent les brins d'ADN pour permettre l'initiation de la réplication
ADN hélicase	Déroule l'hélice d'ADN a la fourche de réplication
Protéines liant l'ADN simple Brien	S'attachent à l'ADN simple brin et empêchent la formation de structures secondaires
ADN gyrase	Se déplace devant la fourche de réplication et élimine les surenroulement positifs -et donc la torsion -créés par le déroulement de l'hélice a la fourche de réplication
ADN primase	Synthétise de courte amorce d'ADN pour fournir un groupe 3'-OH pour l'attachement des nucléotides d'ADN
ADN polymérase III	Allonge une nouvelle chaine polynucléotidique à partir du groupe 3'-OH fourni par l'amorce
ADN polymérase I	Elimine les amorces d'ARN et les remplace par de l'ADN
ADN ligase	Relie les fragments d'Okazaki en ligaturant les entailles dans le squelette sucre-phosphate de l'ADN nouvellement synthétise

II.2 Mutations de l'ADN

II.2.1 Définition de mutation

Une mutation est un changement dans la séquence des bases de l'ADN. Souvent ces mutations modifient le phénotype de la cellule (ses caractéristiques observables). On peut donc classer les mutations ou bien en fonction de la nature du changement subi par l'ADN, ou bien en fonction du changement du phénotype.

En termes moléculaires, il est pratique de diviser les mutations en deux grandes classes : les microlésions, dans lesquelles le changement d'une seule paire de base a eu lieu, et les macrolésions, dans lesquelles des changements plus importants se sont produits. (**Neidhardt et al.,1994**)

II.2.2 Mutagenèse dirigée

Les manipulations in vitro de l'ADN ont ouvert un nouveau champ d'investigations pour la mutagenèse, la mutagenèse in vitro, mieux connue sous le terme de mutagenèse dirigée. Alors que les mutagènes conventionnels introduisent des mutations au hasard au niveau de l'organisme, la mutagenèse dirigée, par l'utilisation d'ADN synthétisé et des techniques de clonage, permet l'introduction de mutations à des sites précis dans les gènes. (**Madigan ; Martinko, 2007**)

II.2.3 Types et causes des mutations de l'ADN

II.2.3.1 Mutation faux-sens

La mutation faux - sens (ou non synonyme) : elle modifie le codon spécifiant un acide aminé donné en un autre codon d'un acide aminé différent ; au final, la séquence protéique est modifiée mais la fonction protéique initiale peut être conservée. (**Vincent, 2007**)

II.2.3.2 Mutation non-sens

La mutation non - sens : elle modifie le codon spécifiant un acide aminé donné en un codon de terminaison (codon stop) ; au final, la séquence protéique est raccourcie, la fonction protéique initiale est généralement perdue. (**Vincent, 2007**)

II.2.3.3 Mutation silencieuse

La mutation synonyme : elle modifie le codon spécifiant un acide aminé donné en un autre codon du même acide aminé au final, la mutation n'a pas d'incidence sur la séquence protéique, on parle aussi de mutation silencieuse. **(Vincent, 2007)**

II.2.3.4 Mutation de décalage de cadre

Les insertions - délétions peuvent avoir les conséquences suivantes : l'addition ou la délétion d'une seule paire de bases modifie le cadre de lecture, à partir du site de mutation jusqu'au codon stop créé par ce décalage de lecture. De façon générale, lorsqu'il y a ajout ou délétion d'un nombre de bases non divisible par 3 dans les régions codantes, ces mutations engendrent un décalage du cadre de lecture. **(Vincent, 2007)**

II.2.3.5 Mutation de duplication

Les duplications (une duplication est la formation d'une copie supplémentaire d'un segment chromosomique) apparaissent à une fréquence remarquablement élevée. **(Neidhardt *et al.*, 1994)**

II.2.3.6 Mutation suppressive

Une mutation supprimeur est une mutation qui masque ou supprime l'effet d'une autre mutation. Ce type de mutation est distinct d'une mutation réverse qui rétablit la séquence de type sauvage. Une mutation sup- presseur se produit à un site distinct de celui de la mutation originale. **(Pierce, 2012)**

II.2.3.7 Mutation létale conditionnelle

D'autres types de mutations sont les mutations conditionnelles, qui ne sont exprimées que dans certaines conditions, et les mutations létales, qui provoquent la mort prématurée de l'organisme affecté. **(Pierce, 2012)**

II.2.3.8 Mutation d'inversion

Des inversions (le renversement de l'ordre de certains gènes) se produisent vraisemblablement chez les bactéries. **(Neidhardt *et al.*, 1994)**

II.2.4 Les agents mutagènes

Les agents mutagènes (rayons X, UV, agents chimiques, etc.) sont généralement caractérisés par une spécificité ou une préférence mutationnelle à propos du site et de la nature des bases modifiées ; ces sites préférentiels sont appelés des points chauds (hot spot). Ces sites correspondent souvent à des séquences répétées. **(Vincent, 2007)**

II.2.4.1 Les agents physiques

II.2.4.1.1 Rayonnement non ionisant (UV) :

Bien que d'une énergie moins forte que les radiations ionisantes, la lumière ultraviolette (UV) est néanmoins hautement mutagène. Les bases puriques et pyrimidiques absorbent facilement la lumière UV, ce qui entraîne la formation de liaisons chimiques entre pyrimidines adjacentes dans un brin d'ADN, et la création de dimères de pyrimidines contenant un anneau cyclobutyle . Les photodimères les plus fréquents sont des dimères de thymine, mais des dimères de cytosine ou de thymine - cytosine peuvent aussi être formés. Les dimères de pyrimidines déforment la structure de l'ADN. **(Pierce, 2012)**

II.2.4.1.2 Rayonnement ionisant (rayons X) :

En 1927, Hermann Muller démontra que les rayons X pouvaient induire des mutations chez la mouche des fruits *Drosophila*. Des études ultérieures ont montré que les rayons X ont un effet mutagène chez tous les organismes. La haute énergie des rayons X, des rayons gamma, et des rayons cosmiques leur permet de traverser les tissus et de provoquer des lésions dans de l'ADN. Ces radiations, appelées radiations ionisantes, délogent les électrons des atomes qu'elles rencontrent et changent des molécules stables en radicaux libres et en ions réactifs, qui à leur tour altèrent la structure des bases et rompent les liaisons phosphodiester dans l'ADN. Les radiations ionisantes provoquent fréquemment des cassures double brin dans l'ADN. La réparation de ces cassures peut être à l'origine de mutations chromosomiques. **(Pierce, 2012)**

II.2.4.2 Les agents chimiques

II.2.4.2.1 Les analogues de bases

Les analogues de bases sont des mutagènes chimiques dont la structure est suffisamment voisine de celle des bases standard de l'ADN pour qu'ils puissent être incorporés dans l'ADN par l'ADN polymérase. Par exemple, le 5 – bromo - uracile (5BU) est un analogue

de la thymine, dans lequel un atome de brome (Br) remplace le groupement méthyle sur l'atome de carbone 5. Normalement, le 5 – bromo – uracile s'apparie avec l'adénine, comme le fait la thymine, mais la présence du brome modifie la distribution des électrons et favorise la formation spontanée d'une forme ionisée qui s'apparie avec la guanine, provoquant l'apparition d'une transition (T-A→5BU - A→5BU - G → C - G). Toujours par mauvais appariement, le 5 - bromo- uracile peut aussi être incorporé en regard d'une guanine dans une chaîne en cours de synthèse. Au cycle de réplication suivant, le 5 - bromo - uracile s'apparie avec l'adénine, ce qui induit une autre transition (G - C → G - 5BU→ A - 5BU → A - T).

La 2 - aminopurine (2AP), un analogue de l'adénine, est un autre mutagène chimique qui provoque des transitions. La 2 - aminopurine s'apparie normalement avec la thymine, mais sous forme protonée, elle peut aussi s'apparier avec la cytosine (T - A→T - 2AP→C - 2AP→C - G). Toujours par mauvais appariement, la 2 - aminopurine peut aussi être incorporée en regard d'une cytosine et, par la suite, s'apparier avec une thymine, induisant une transition C - G→C - 2AP → T - 2AP → T - A. **(Pierce, 2012)**

II.2.4.2.2 L'acide nitreux

En plus de son occurrence spontanée, la désamination peut aussi être induite chimiquement. Par exemple, l'acide nitreux désamine la cytosine par oxydation, générant de l'uracile qui s'apparie avec l'adénine au cycle de réplication suivant, et produit une transition C - G → T - A. L'acide nitreux désamine aussi la guanine pour donner la xanthine qui a une faible spécificité d'appariement, puisqu'elle peut s'apparier aussi bien avec la cytosine qu'avec la thymine, et dans ce dernier cas, induire une transition C - G→T - A. Étant donné que l'acide nitreux peut induire des mutations de transition de sens opposé, il peut donc induire aussi leur réversion. **(Pierce, 2012)**

II.2.4.2.3 L'hydroxylamine

L'hydroxylamine est un mutagène extrêmement puissant, qui change spécifiquement la cytosine en N (4) -hydroxycytosine, laquelle s'apparie avec l'adénine et induit des transitions C - G→T - A. Comme l'hydroxylamine n'agit que sur la cytosine, elle ne peut induire la réversion des mutations qu'elle produit. **(Pierce, 2012)**

II.2.4.2.4 Les agents intercalants

La proflavine, l'acridine orange, le bromure d'éthidium, et les dioxines sont des agents intercalants, qui produisent des mutations en s'insérant entre les bases empilées de l'ADN. La structure tridimensionnelle de la double hélice est déformée et cette distorsion provoque des insertions et des délétions d'un nucléotide à la réplication. Ces insertions et délétions décalent fréquemment le cadre de lecture, et l'effet mutagène des agents intercalants est donc sévère. Comme ces agents génèrent à la fois des additions et des délétions, ils peuvent supprimer les effets de leurs propres mutations en rétablissant le cadre de lecture. **(Pierce, 2012)**

II.2.4.2.5 Les agents alkylants

Les agents alkylants sont des composés chimiques qui servent de donneurs de groupement alkyle, comme les groupements méthyle (CH₃) ou éthyle (CH₃-CH₂), dans des réactions d'alkylation des bases de l'ADN. Par exemple, l'éthyl - méthanesulfonate (EMS) donne un groupement éthyle à la guanine, ce qui produit la 0⁶ - éthylguanine qui s'apparie avec la thymine. Donc, l'EMS induit des transitions C - G → T - A. L'EMS peut aussi fournir un groupement éthyle à la thymine, produisant la 4 - éthylthymine qui s'apparie avec la guanine, générant une transition T - A → C - G. Puisque l'EMS induit des transitions C - G → T - A et T - A → C - G, les mutations induites par l'EMS peuvent faire l'objet d'une réversion par un second traitement par l'EMS. Le gaz moutarde est aussi un agent alkylant. **(Pierce, 2012)**

II.2.4.3 Les agents biologiques

II.2.4.3.1 Les transposons

La transposition est le déplacement d'un élément transposable d'un site à un autre. Il existe différents mécanismes de transposition chez les procaryotes et les eucaryotes. Cependant, tous ces mécanismes ont une série de caractéristiques en commun : (1) des coupures décalées sont pratiquées dans l'ADN cible ;

(2) l'élément transposable est joint aux extrémités simple brin en saillie de l'ADN cible ; et
(3) une réplication d'ADN remplit les brèches simple brin.

Une très vaste majorité des éléments transposables s'insère de façon aléatoire dans le génome et donc dans des gènes dont la fonction est le plus souvent perdue. La transposition est donc généralement mutagène. **(Pierce, 2012)**

II.2.5 Les mécanismes de réparation des mutations dans l'ADN

L'ADN est constamment exposé à des radiations, des mutagènes chimiques, et des changements spontanés qui menacent son intégrité. En dépit de cet assaut d'agents délétères, le taux de mutation reste extrêmement bas grâce à l'efficacité des systèmes de réparation. On estime que moins d'une lésion sur mille donnera lieu à une mutation ; toutes les autres sont réparées.

Il existe plusieurs systèmes assez complexes de réparation de l'ADN, mais il est important de dégager certains principes généraux. En premier lieu, la majorité des mécanismes mettent en jeu les deux brins de l'ADN parce qu'ils remplacent des nucléotides entiers (et pas seulement des bases), et que la présence d'un brin matrice est indispensable pour spécifier une séquence nucléotidique complémentaire.

Une seconde caractéristique générale est la redondance. De nombreux types de lésions peuvent être corrigés par plus d'un système de réparation. Cette redondance témoigne de l'importance extrême de la réparation de l'ADN pour la survie d'une cellule : elle assure que presque toutes lésions soient réparées et que les erreurs de réplication soient corrigées. Si une faute ou une lésion échappe à un système de réparation, il est probable qu'elle soit réparée par un autre système. (Pierce, 2012)

II.2.5.1 La réparation par excision de la base (BER)

Un autre type de réparation est la réparation directe, qui ne remplace pas les nucléotides altérés, mais rétablit la structure correcte de leur base. Par exemple, une enzyme appelée O⁶-méthylguanine - ADN méthyltransférase élimine le groupement méthyle de la O⁶-méthylguanine, un produit d'alkylation de la guanine qui s'apparie avec l'adénine et provoque des transversions G - C → A - T, et rétablit ainsi la guanine originale.

Dans la réparation par excision de base, une base modifiée est d'abord excisée par une ADN glycosylase, créant un site apurique ou apyrimidique qui est réparé par un autre système. Il existe de nombreuses ADN glycosylases, spécifiques chacune d'un type de base modifiée. Par exemple, l'uracile glycosylase reconnaît et élimine l'uracile produite par la désamination de la cytosine. D'autres glycosylases reconnaissent l'hypoxanthine, la 3 - méthyladenine, la 7 - méthylguanine, ou Un encore d'autres bases modifiées. (Pierce, 2012)

II.2.5.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)

Dernier système de réparation auquel nous nous intéresserons, mais notre liste est loin d'être exhaustive, est la réparation par excision de nucléotides, aussi appelée excision généralisée, qui élimine les lésions volumineuses (comme les dimères de pyrimidines) qui déforment la double hélice. L'excision de nucléotides peut réparer des lésions de types très divers. Ce système existe chez tous les organismes, des bactéries à l'homme, et c'est un des systèmes de réparation les plus importants. **(Pierce, 2012)**

II.2.5.3 Réparation des mésappariements

Lors de la réplication, les brins néosynthétisés sont contrôlés par l'activité de correction (proofreading) 3'→5' de l'ADN polymérase. Cependant, cette activité n'est pas sans erreur, et des systèmes de réparation la complètent, pendant ou après la réplication. Ces systèmes peuvent différencier le brin matrice du brin néosynthétisé (différence de méthylation chez les bactéries), ce qui leur permet d'identifier la base correcte (présente sur le brin matrice) en face de laquelle la base homologue sera remplacée. **(Vincent,2007)**

II.2.5.4 Réparation par recombinaison homologue

Il s'agit d'un mécanisme propre aux cellules en division, qui utilise la chromatide sœur pour réparer les cassures double - brin, ce qui assure le moins d'erreur possible. Ce mécanisme, appelé recombinaison homologue, peut se résumer ainsi ;

- fixation d'enzymes aux extrémités cassées et digestion 5'→3', générant des extrémités simple - brin ;
- les extrémités libres envahissent la région homologue de la chromatide sœur : une courte molécule mixte se forme entre l'ADN endommagé et son homologue ;
- un fragment de la chromatide sœur sert de matrice à la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase. **(Vincent,2007)**

II.2.5.5 Réparation par recombinaison non homologue (NHEJ)

Il s'agit d'un mécanisme en 3 étapes réalisé dans les cellules qui ne se divisent plus, ce qui ne permet donc pas l'utilisation de la chromatide sœur comme matrice :

- liaison d'un complexe protéique (dont une protéine kinase) aux extrémités cassées ;
- égalisation des extrémités ;

- ligature (réunion) des extrémités. (**Vincent,2007**)

CHAPITRE III

Matériel et Méthodes

Le but de travail est exposé des bactéries sélectionnées au rayonnement ultraviolet pendant deux périodes de temps différentes et très espacées afin de déterminer son effet sur la mort cellulaire et la possibilité de provoquer des mutations de résistance aux antibiotiques et des mutations auxotrophes et de changement de taille.

III.1 Problématique

Le rayonnement ultraviolet est un facteur qui affecte les bactéries principalement sur les gènes, de sorte qu'il les inhibe où les stimule. Lorsqu'il est utilisé en laboratoire, il nous permet de prendre un nouveau modèle de bactéries et les changements qui se produisent dans celles-ci. Alors, quels sont les changements génétiques qui se produisent chez les bactéries, notamment leur mort, leur résistance aux antibiotiques et les modifications de leur profil nutritionnel lorsqu'elles y sont exposées ?

III.2 Cadre d'étude

Pour ce travail, nous avons mené l'étude au Laboratoire Universitaire de L'ines de Recherche en Microbiologie et Biologie Végétale de Mostaganem pendant 3 mois.

III.3 Origine des isolats

Staphylococcus aureus : Institut Pasteur Code : ATCC 25923

Klebsiella pneumoniae : Institut Pasteur Code : ATCC 700603

III.4 Les milieux de cultures

III.4.1 Les milieux solides

Le milieu solide est le milieu le plus utilisé dans les laboratoires de microbiologie. Il est préparé pour la croissance des bactéries, la formation de leurs colonies et la facilité de leur visualisation. A l'état liquide, sa température est de 100, et pour le verser. Dans des boites

de Pétri, il est abaissé à 50° dans un bain-marie, ce qui donne une surface lisse et solide.

III.4.1.1 Milieu Luria-Bertani :

C'est un milieu de culture qui contient des nutriments nécessaires à la reproduction des bactéries, sur lequel *Klebsiella pneumoniae*, forme des colonies jaune aux, et *Staphylococcus aureus*, les colonies sont blanches. Ce milieu permet la croissance de bactéries autotrophes et auxotrophes. (Annexe 1) (Annexe 6)

III.4.1.2 Milieu minimum :

C'est un milieu riche en sels minéraux et pauvre en nutriments. Par conséquent, seules les bactéries autotrophes s'y développent. Il a une couleur transparente et *klebsiella pneumoniae* est l'une des bactéries qui ont la capacité de s'y reproduire. (Annexe 2) (Annexe 6)

III.5 Les milieux liquides

III.5.1 Bouillon Luria :

C'est un milieu de culture pour la reproduction des bactéries. Il présente les mêmes caractéristiques que le milieu solide, mais s'en distingue par le fait qu'il ne contient pas d'agar-agar, ce qui lui confère un état liquide. Il est placé dans des tubes ou des flacons afin de le stériliser puis être utilisé en repiquage. (Annexe 6)

III.6 Technique d'étude

III.6.1 L'ensemencement

Dans des boîtes de Petri d'un diamètre de 90 mm contenant 18 ml de milieu (LB, MM), l'ensemencement est effectué à l'aide d'une anse de platine, une seule colonie est transportée et placée sous forme des Stries à la surface du milieu solide. Elle est ensuite incubée dans l'incubateur à 37° pendant 24 h, et lorsque les bactéries se développent, le résultat est interprété.

III.6.2 Le repiquage

Il s'agit du processus de transfert d'une seule colonie de n'importe quel micro-organisme par une anse de platine déjà flambée de milieu dans lequel il s'est développé vers un milieu liquide stérile et nutritif.

Dans une zone stérile à l'aide d'un bec benzène, on prend une seule colonie isolée de *Staphylococcus aureus* et de *Klebsiella pneumoniae*, et mettre dans deux flacons de LB liquide stérile et ont incubé dans un orbital incubateur agitateur à 37° degré pendant 24h, le nombre de tours est estimé à 160 tours par minute. (**Annexe 5**)

III.6.3 Exposition au rayon ultraviolet

III.6.3.1 Dilution et étalement

III.6.3.1.1 Dilution et étalement de témoin

Après la fin du repiquage, un volume de la suspension bactérienne de *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* a été prélevé et rempli dans deux tubes stériles, après quoi une dilution a été réalisée sur ceux-ci, ce qui s'est déroulé comme suit :

- 6 tubes ont été remplis de 9 ml d'eau distillée et ont été stérilisés. Un millilitre de la suspension bactérienne dans le tube a été prélevé via une micropipette et placé dans un tube de dilution (-1), puis de tube (-1) à tube (-2), et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il atteigne le dernier tube (-6). (**Figure 6, 7**)
- Ensuite, 250ul ont été prélevés dans les tubes de dilution (-5) et (-6) à l'aide d'une micropipette et placés dans deux boîtes de Pétri remplies de milieu LB solide.

Ce processus a été effectué pour chaque suspension bactérienne, après quoi l'étalement a été effectué :

La pipette pasteur est ensuite préparée en changeant sa forme en râteau dans du bec benzène pour être utilisée dans l'étalement, et enfin elle est incubée à l'étuve pendant 48 h à une température de 37°. (**Annexe 4**)

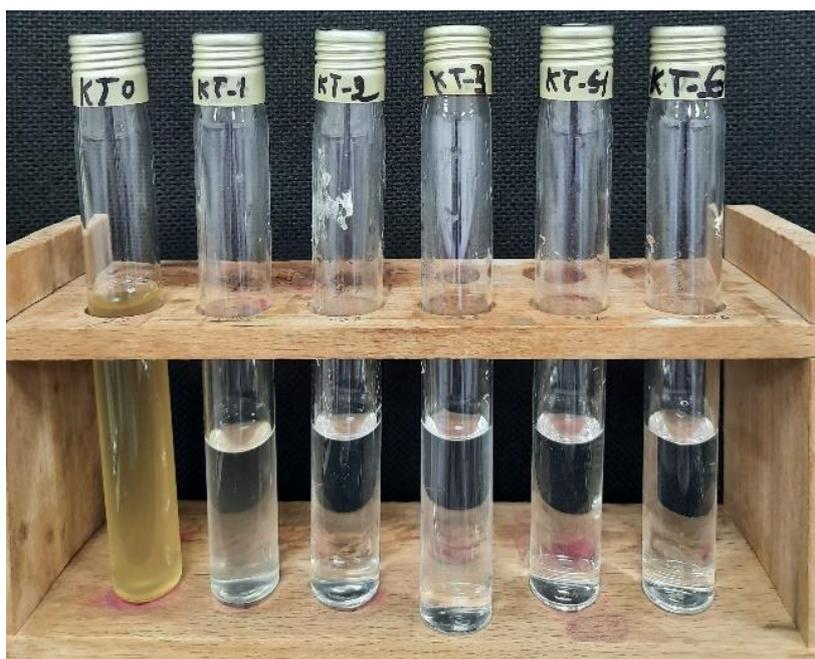


Figure 6 : les tubes de la suspension de témoin de *Klebsiella pneumoniae* avant l'irradiation de UV.



Figure 7 : les tubes de la suspension de témoin de *Staphylococcus aureus* avant l'irradiation de UV.

III.6.3.1.2 Dilution et étalement de suspension exposée aux UV

Deux boîtes de *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* ont été exposées aux radiations :

La première boîte pendant 8 minutes et la seconde boîte pendant 16 minutes. Quand La suspension bactérienne restante a été vidée pour les deux bactéries, de sorte aux *Staphylococcus aureus*, une boîte a été exposée aux radiations pendant 16 minutes.

Les mêmes étapes de travail appliquées au témoin ont été suivies (**Figure 8,9,10**), de sorte que *klebsiella pneumoniae* dispose de deux boîtes de Pétri (-5) et (-6) pour chaque temps d'exposition, tandis que *Staphylococcus aureus* dispose d'une boîte de Pétri (-5). (**Annexe 3**)



Figure 8 : les tubes de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* après l'irradiation de UV dans une durée de 8 min.



Figure 9 : les tubes de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* après l'irradiation de UV dans une durée de 16 min.



..Figure 10 : les tubes de la suspension de *Staphylococcus aureus* après l'irradiation de UV dans une durée de 16 min.

Remarque : Pour le master 3 et 4, une seconde dilution a été réalisée.

III.6.3.2 Antibiogramme par disque

250 µl de suspension bactérienne ont été placés Dans chaque boîte de Pétri contenant le milieu LB solide et séparément pour chacun des *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, et un certain nombre de disques ont été placés dans chacun d'eux comme suit :

- Dans *Klebsiella pneumoniae*, ont été placés 3 disques, à savoir :

1. NEOMYCIN, 2. NORFLOXACIN, 3. AMOXICILLIN

- Pour *Staphylococcus aureus*, 6 disques ont été placés :

1. NEOMYCIN, 2. AMOXICILLIN, 3. NORFLOXACIN,
4. OXACILLIN, 5. NALIDIXIC ACID, 6. CARBENICILLIN.

Enfin, les boîtes ont été placées dans un incubateur pendant 24 heures à 37°C.

Cette méthode a été utilisée pour déterminer la sensibilité des bactéries aux types d'antibiotiques utilisés.

Après l'apparition des résultats, deux types d'antibiotiques ont été pris :

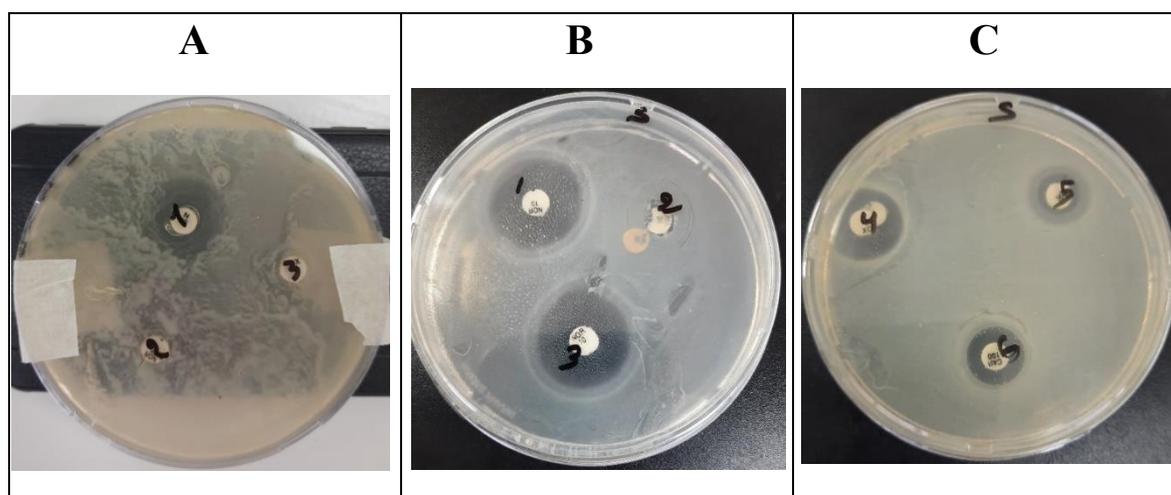
Pour *Klebsiella pneumoniae* : néomycine (de concentration 30 mg/ml) qui est le seul à avoir formé la zone d henybytion.

Pour *Staphylococcus aureus* : néomycine (de concentration 30 mg/ml) et norofloxacin (de concentration 10mg/ml) Qui formaient la zone d henybytion de plus grand diamètre, ce qui signifie la plus grande sensibilité de *Staphylococcus aureus* à leur égard . **(Figure 11)**

Ensuite, deux types d'antibiotiques de la même famille que la néomycine (gentamicine) et la norofloxacin (ciprofloxacine) ont été acquis, comme le montre le tableau 2, afin de les utiliser dans Repiquage sur velours (Velvet replica plating) chez *Klebsiella pneumoniae* et Antibiogramme de *Staphylococcus aureus* après la dilution de leurs concentrations. **(Tableau 2)**

Tableau 2 : la famille d'antibiotique de néomycine et la norofloxacin.

La famille	Antibiotique de la même famille	
Aminoside	néomycine	Gentamicine
Quinolones	norofloxacin	ciprofloxacine

**Figure 11** : Antibiogramme par disque de *Klebsiella pneumoniae* (A) et *Staphylococcus aureus* (B), (C).**III.6.3.2.1 Dilution de L'antibiotique :**

25 mg de ciprofloxacine (comprimé de 500 mg) ont été écrasés puis bien agités dans 9 ml d'eau distillée dans un tube. Ensuite, 1 ml de cette solution a été prélevé à l'aide d'une micropipette et versé dans un autre tube contenant également 9 ml d'eau distillée. La concentration de cette nouvelle solution a été estimée à 2,5 mg/ml.

-1 ml d'une ampoule de l'antibiotique gentamicine (80mg/2ml) a été prélevé et versé dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérilisée, afin d'obtenir une concentration de 4 mg/ml.

- À partir des tubes contenant des solutions de 2,5 mg/ml et de 4 mg/ml, la dilution des deux antibiotiques a été réalisée de la même manière afin d'obtenir des concentrations de 0,25 mg/ml et 0,4 mg/ml respectivement.

III.6.3.3 Antibiogramme par disque préparés chez *Klebsiella pneumoniae*

L'écouvillon a été immergé dans la suspension bactérienne et des stries bien définies ont été tracées sur le milieu LB solide. Ensuite, les disques ont été immergés dans des solutions d'antibiotiques à différentes concentrations, puis placés dans la boîte de Pétri et incubés pendant 24 heures à 37°C.

III.6.3.4 La sélection des mutations chez *Klebsiella pneumoniae*

Après la formation de colonies à partir de la suspension bactérienne exposée aux radiations, les colonies ont été transférées à l'aide de cure-dents stériles et ensemencées d'une manière ordonnée dans quatre boîtes de Pétri (Master Plate 1, 2, 3, 4) préalablement marquées de 73 points chacune et remplies de milieu solide LB (**Figure 12**). Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures.

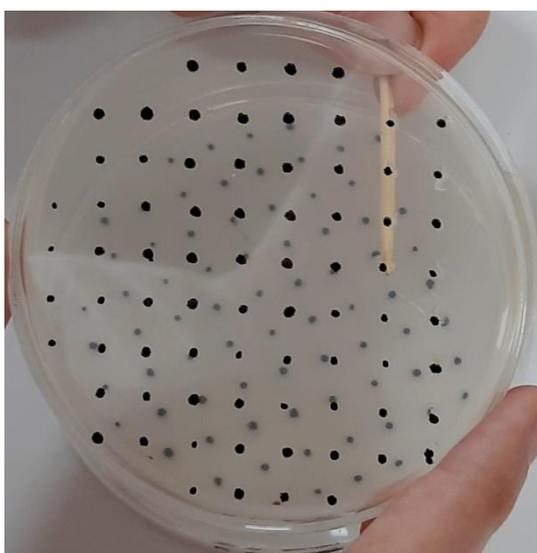


Figure 12 : Ensemencement des Master plates de *Klebsiella pneumoniae*

III.6.3.4.1 Préparations de milieu LB + Antibiotique

Après avoir obtenu le résultat des antibiogrammes par disques. L'antibiotique a été incorporé dans le milieu LB liquide. À l'aide de micropipette :

- 960 ul d'antibiotique gentamicine (0,4 mg/ml), ont été ajoutés dans un flacon de 120 ml de milieu LB. (Pour Master plates 1 et 2)

- 1000 ul d'antibiotique gentamicine (4 mg/ml), ont été placés dans un flacon de 150 ml de LB. (Pour Master boîte plates 3 et 4). On suit la même procédure précédente pour la concentration de Gentamicine 2mg/ml

Le milieu LB a été bien mélangé à l'antibiotique et vidé dans des boîtes de Pétri pour sécher.

III.6.3.5 Témoin de Repiquage sur velours (Velvet replica plating) :

Pour le témoin, 250ul ont été prélevés du flacon de repiquage de *Klebsiella pneumoniae* et versés sur trois boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide avec la gentamicine dans les deux concentrations de 2 et 4 mg/ml. Puis l'étalement et l'incubation ont été effectués pendant 24h à 37°.

III.6.3.6 Repiquage sur velours (Velvet replica plating)

Après l'incubation des Master plates, les 72 colonies de chaque MP ont été transférées simultanément vers les milieux de section à l'aide d'un tampon du même diamètre que la boîte de Pétri comme suit :

Les colonies du master plate 1 ont été transférées à une boîte de Pétri contenant le milieu MM.

Les colonies du master plate 2 ont été transférées dans une boîte de Pétri contenant le milieu MM ainsi qu'une boîte de LB + l'antibiotique gentamicine (0,4.mg/ml).

Les colonies du master plates 3 et 4 ont été transférés dans deux boîtes de Pétri contenant le milieu MM et quatre boîtes de LB + l'antibiotique gentamicine à différentes concentrations : deux boîtes avec une concentration de 4 mg/ml et deux boîtes avec une concentration de 2 mg/ml.

Ensuite, ils ont été incubés à 37° pendant 24 heures.

III.6.3.7 Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*

Deux méthodes différentes ont été utilisées : la première pour déterminer la sensibilité de *Staphylococcus aureus* à différentes concentrations de l'antibiotique et la seconde pour montrer la présence de la mutation de résistance.

III.6.3.7.1 La méthode 1 : Antibiogramme par disque préparés

La méthode des disques préparés a été utilisée selon la dilution précédente de l'antibiotique, de sorte que 3 disques de papier Whatman stériles (8mm) ont été immergés dans des solutions d'antibiotique à différentes concentrations comme suit : deux disques dans la solution de gentamicine (4 mg/ml et 2 mg/ml), et un disque dans la solution de ciprofloxacine (0,25 mg/ml). Ensuite, l'écouvillon a été immergé dans un flacon de repiquage de *Staphylococcus aureus* et des stries bien série été réalisée sur milieu LB, puis les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C (Annexe 4).

III.6.3.7.2 Préparations de milieu LB + Antibiotique

Pour la gentamicine de concentration de 2 et 4 mg/ml les mêmes étapes de préparation de milieu LB + Antibiotique chez *Klebsiella pneumoniae* ont été suivies que dans les Masters 3 et 4. Pour l'autre antibiotique un volume de 960 µl de ciprofloxacine ont été prélevés à la concentration de 0,25 mg/ml et versés dans un flacon de 120 ml de LB. Ensuite, 6 boîtes de Pétri ont été remplies du mélange et laissées sécher.

III.6.3.7.3 La méthode 2 : Antibiogramme de LB mélangé avec Antibiotique

Pour la suspension bactérienne sans UV :

500ul de la suspension bactérienne après le repiquage ont été prélevés et placé et étaler dans la boîte de LB sans antibiotique et les boite de LB +antibiotique de gentamicine de concentration de 2 et 4 mg/ml et ciprofloxacine de concentration de 0,25 mg/ml, Ils ont ensuite été incubés à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

Pour la suspension bactérienne exposées aux UV:

500ul de la suspension bactérienne après 16 min d'UV ont été prélevés et placé et étaler dans Les même boîtes qui a été utilisé pour la suspension bactérienne sans UV, Ils ont ensuite été incubés à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

III.6.3.8 Sélection des phénotypes de morphologie

Lors de la sélection des différents phénotypes possibles de la boîte 16-5, des petites et grandes colonies ont été observées. Ces colonies ont été repiquées à l'aide d'une anse de platine dans une boîte de Pétri, puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

IV. Résultats

IV.1 Aspect macroscopique

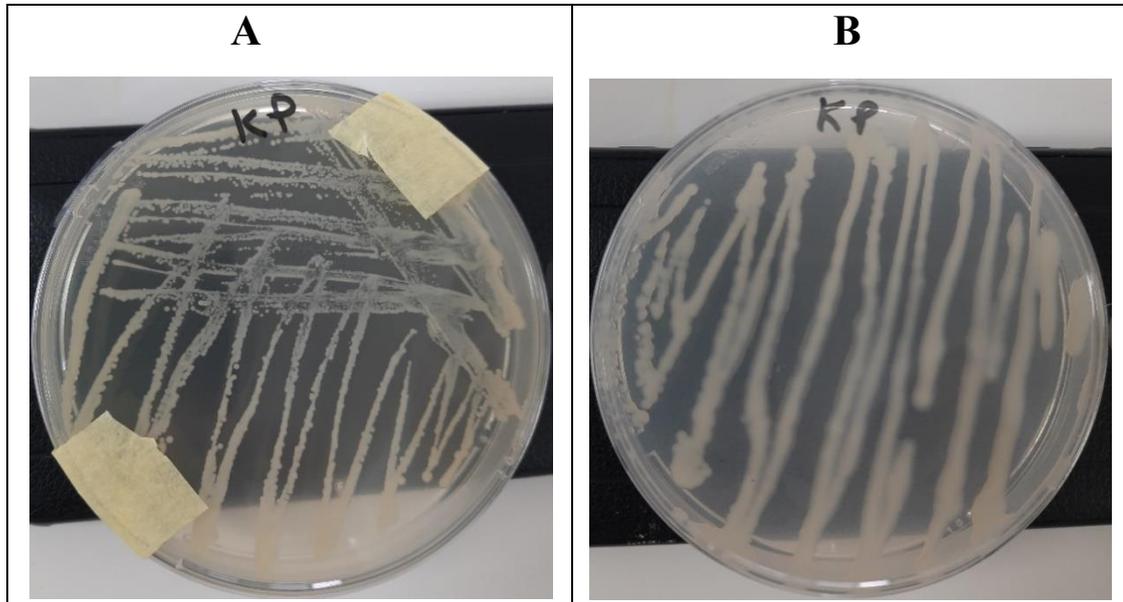


Figure 13 : Aspect macroscopique des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur MM(B) et LB(A).

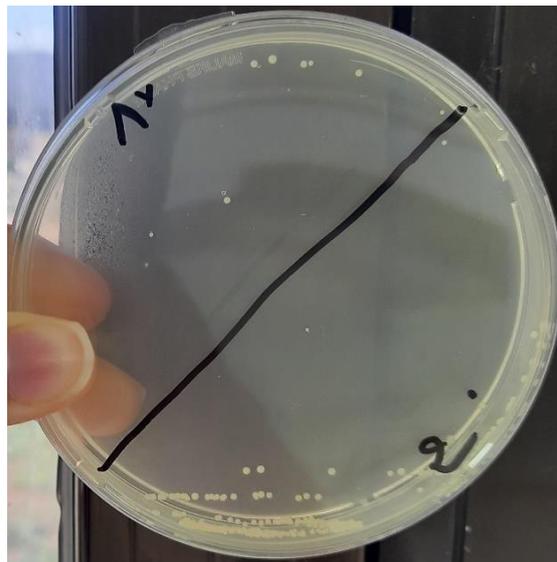


Figure 14 : Aspect macroscopique des colonies de *Staphylococcus aureus* sur LB.

Après avoir effectué l'ensemencement des deux bactéries et les avoir incubées, les résultats ont été interprétés comme suit : Quant à *Klebsiella pneumoniae*, ses colonies sont apparues en jaune dans les milieux LB et MM. (Figure 13) Quant au *Staphylococcus aureus*, il donne une couleur blanche à ses colonies en milieu LB. (Figure 14)

IV.2 L'effet de l'UV sur la survie des isolats

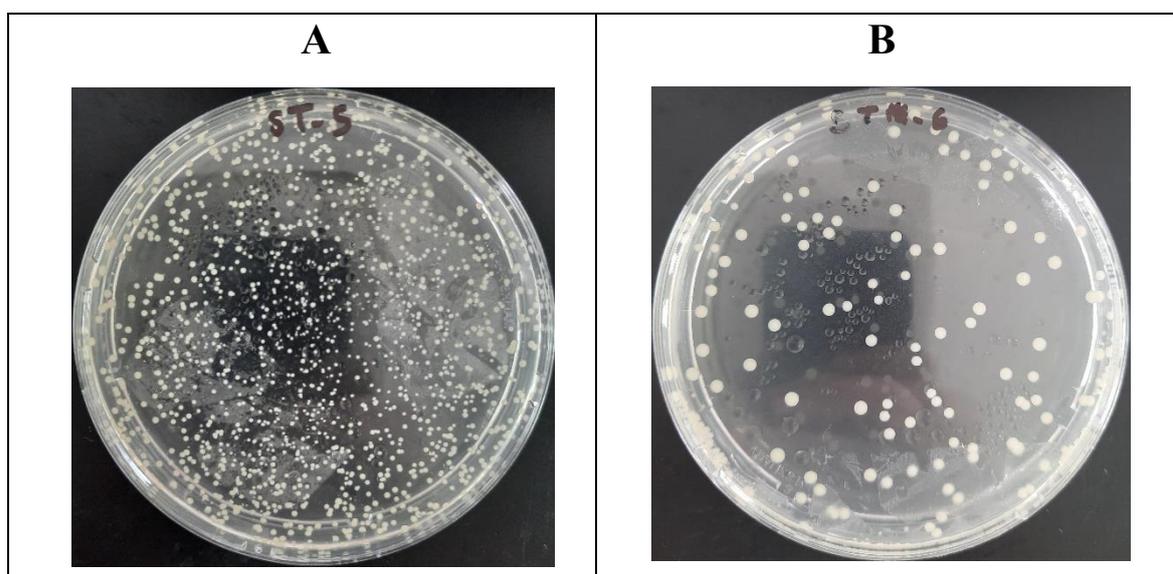


Figure 15 :la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* avant l'irradiation par UV a dilutions de -5 (A) et -6 (B).

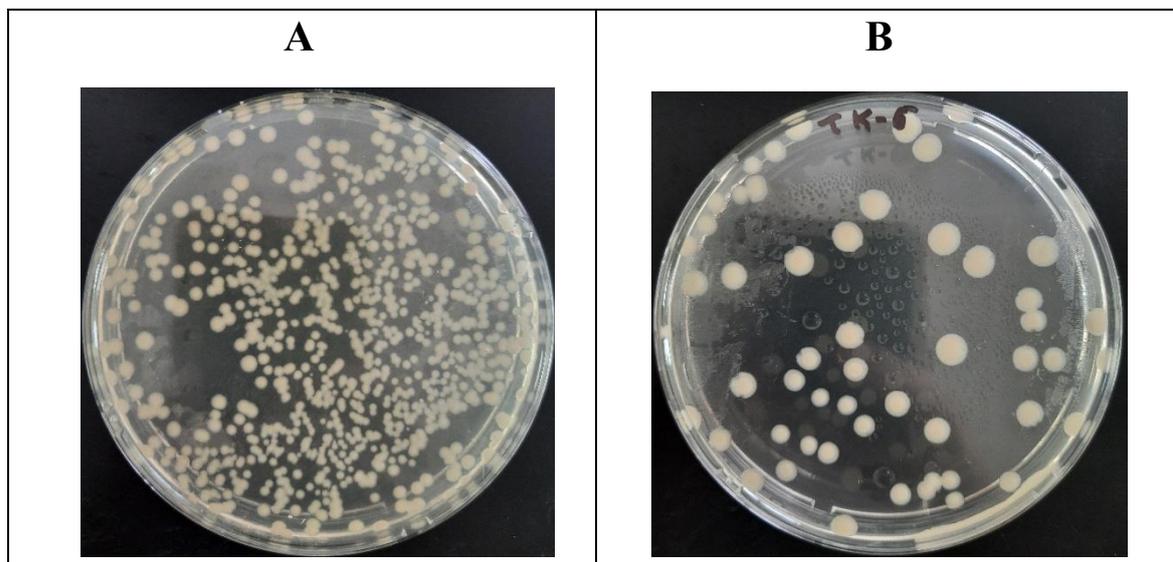


Figure 16 :la croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* avant l'irradiation par UV a dilutions de -5 (A) et -6 (B).

Après avoir effectué la dilution, l'étalement et l'incubation du témoin, les boîtes de Pétri (-5) et (-6) ont été examinées pour chaque bactérie. Quant à *Staphylococcus aureus* colonies apparaissent différemment puisque dans la boîte (-5) elles sont petites, rapprochées et denses. Quant à la boîte (-6), ils sont nets à l'œil nu, éloignés les uns des autres et peu nombreux. (Figure 15) Quant au *klebsiella pneumoniae* il suivait la même approche de croissance que le *Staphylococcus aureus* en termes de densité dans une boîte (-5) et ses colonies paraissaient grandes. De plus, dans la boîte (-6), cela a donné très peu de colonies et une très grande taille. (Figure 16)



Figure 17 : la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* après l'irradiation par UV de durée de 16 min à dilutions de -5.

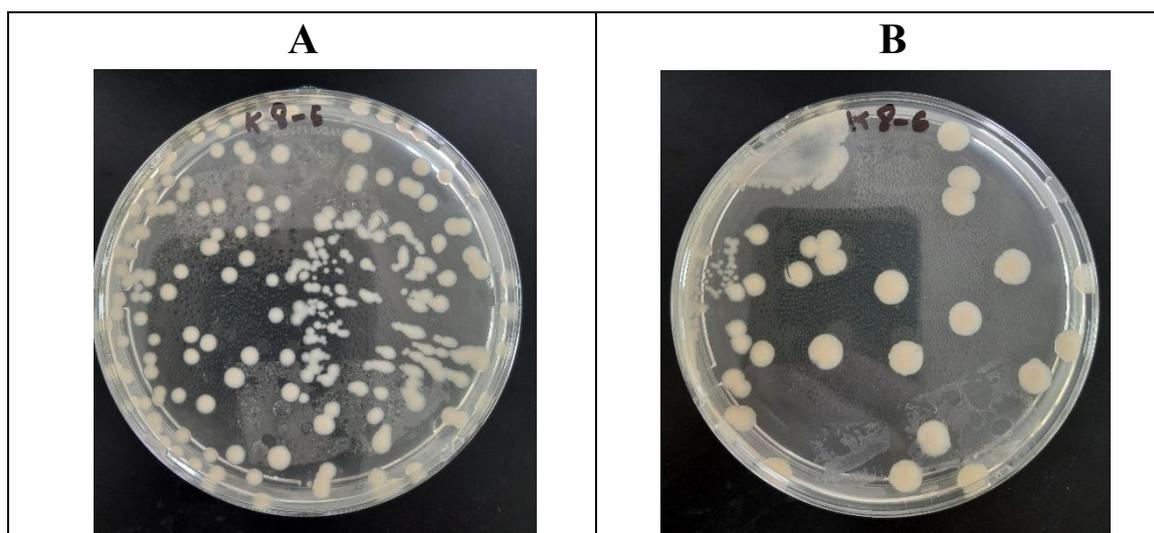


Figure 18 :la croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l’irradiation par UV de durée de 8 min a dilutions de -5 (A) et -6 (B).

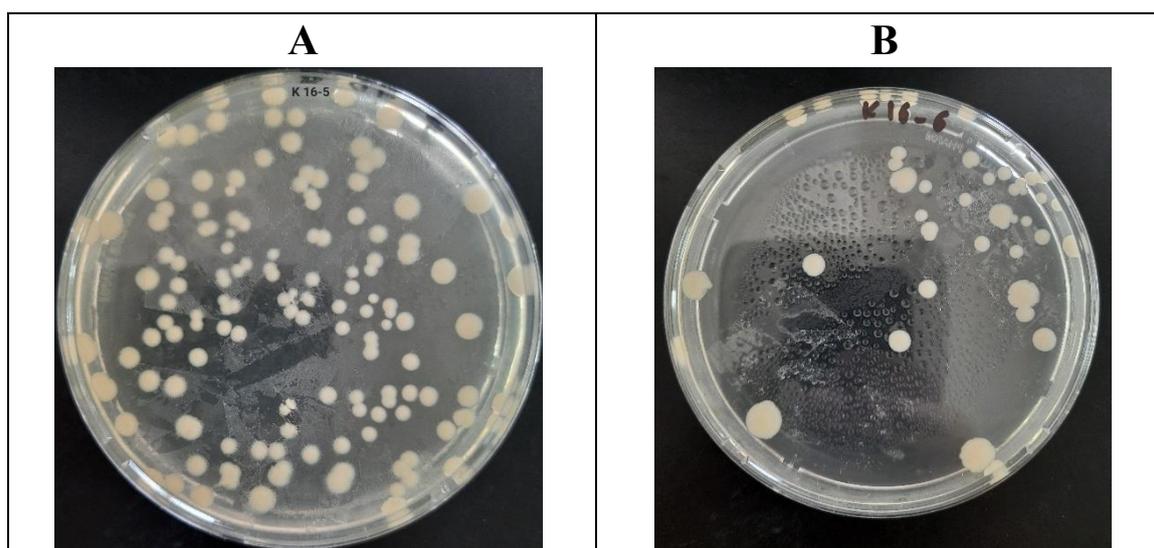


Figure 19 :la croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l’irradiation par UV de durée de 16 min a dilutions de -5 (A) et -6 (B).

La dilution, l'étalement et l'incubation des deux bactéries exposées aux UV ont donné les résultats suivants : Quant aux *Staphylococcus aureus*, après l'avoir exposé pendant 16 minutes, sont apparues des colonies très espacées d'un côté et rapprochées de l'autre, en plus d'une différence de leur taille les unes par rapport aux autres. **(Figure 17)**

Quant à *klebsiella pneumoniae*, exposée pendant 8 minutes, ses colonies sont apparues en grande forme et en très petit nombre dans la boîte (-6), mais dans la boîte (-5), les colonies ont pris une taille et un nombre moyens. **(Figure 18)** Quant aux colonies exposées pendant 16 minutes dans les boîtes (-5) et (-6), elles ont pris des tailles différentes. **(Figure 19)**

Tableau 3 : le nombre de colonies en UFC/ml chez *klebsiella pneumoniae* après l'exposition à l'UV a différents temps.

Temps	T (0)	8 min	16 min
N colonies	232	928	572
Survive (UFC/ml)	232×10^6	928×10^5	572×10^5
Pourcentage %	100 %	40%	25%

Tableau 4 : le nombre de colonies en UFC/ml chez *Staphylococcus aureus* après l'exposition à l'UV a différents temps.

Temps	T (0)	16 min
N colonies	820	76
Survive (UFC/ml)	820×10^6	76×10^6
Pourcentage %	100 %	9 %

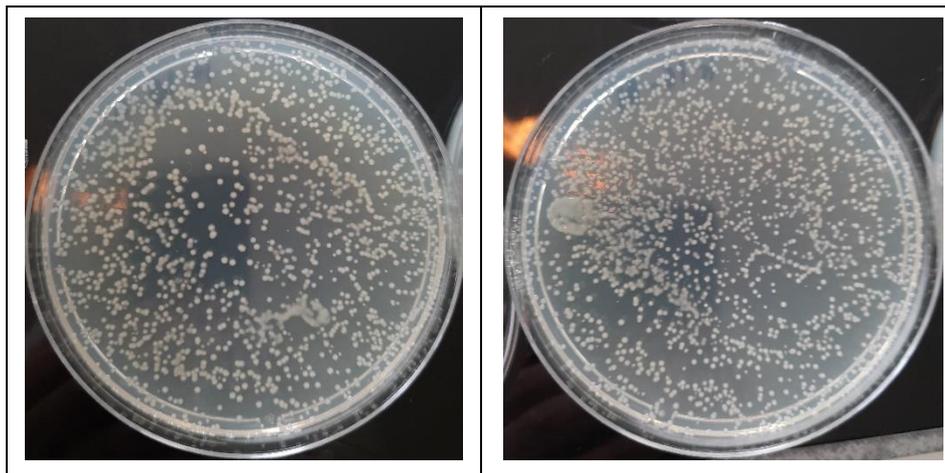


Figure 20 :la croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l’irradiation par UV de durée de 16 min a seconde dilution de - 4.

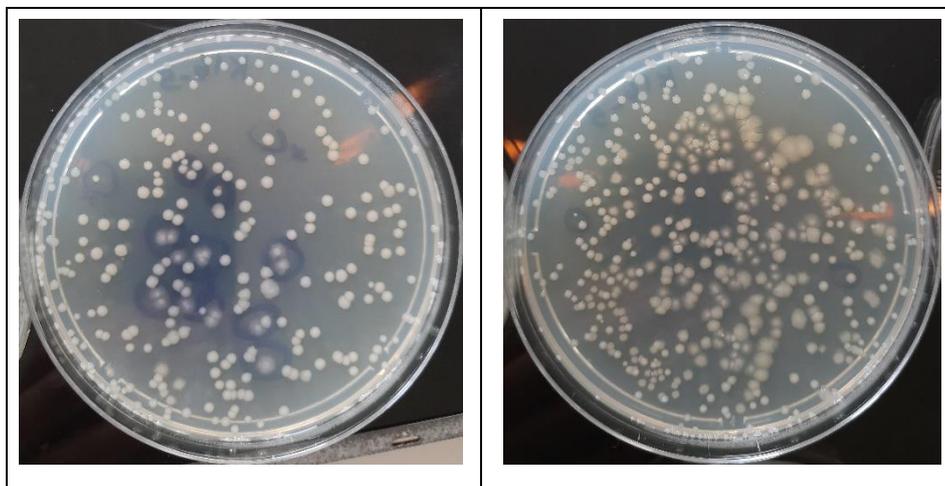


Figure 21 :la croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après l’irradiation par UV de durée de 16 min a seconde dilution de – 5.

Remarque : la deuxième dilution a le même résultat que la première.



Figure 22 : Antibiogramme par disques chez *Klebsiella pneumoniae* a différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (A) et 2 mg/ml (B) et 0.4 mg/ml (C)) et de ciprofloxacine (2.5 mg/ml(D) et 0.25 mg/ml(E)).

Apparition de zones d'inhibition de différents diamètres après immersion des disques dans des tubes des antibiotiques de la gentamicine et ciprofloxacine. **(Figure 22)**

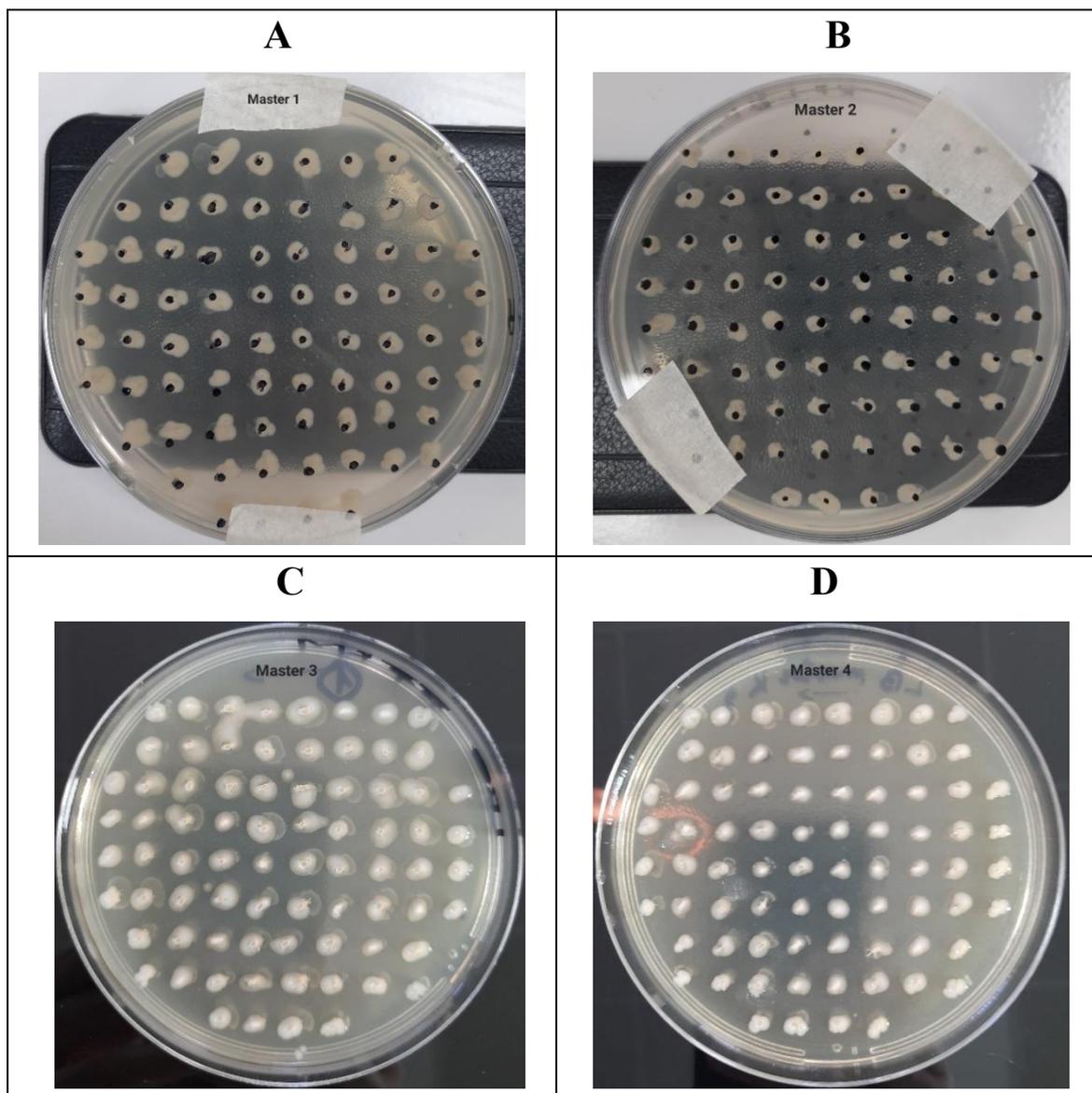


Figure 23 :la croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* après la sélection de master 1(A) et 2(B) et 3(C) et 4(D).

Des colonies sont apparues à tous les points de plantation. **(Figure 23)**

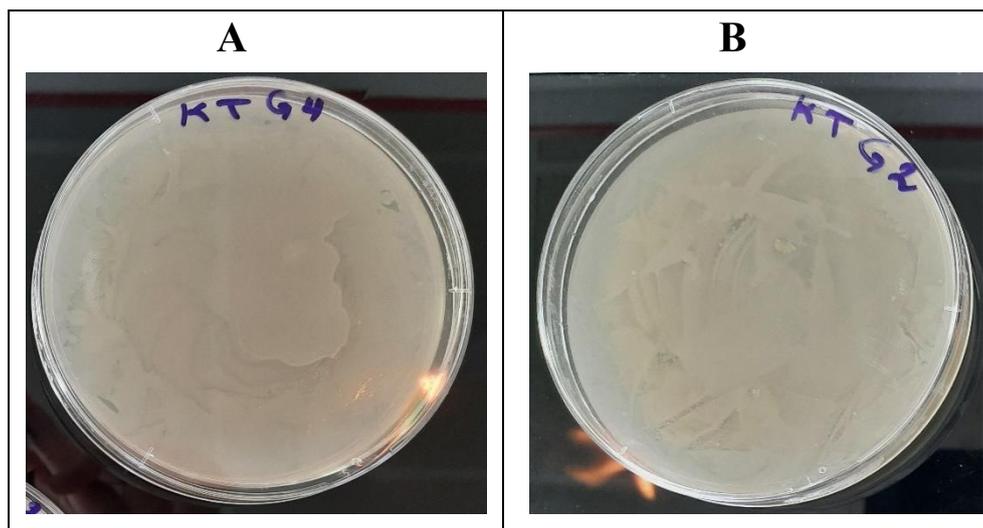


Figure 24 : La croissance bactérienne de *klebsiella pneumoniae* avant l’irradiation par UV dans deux concentrations d’antibiotique de gentamicine (4mg/ml(A) et 2 mg/ml(B)).

Apparition d'un tapis bactérien dans des boîtes de milieu LB avec la gentamicine aux deux concentrations 2 et 4 mg/ml et désignée pour le témoin. **(Figure 24)**

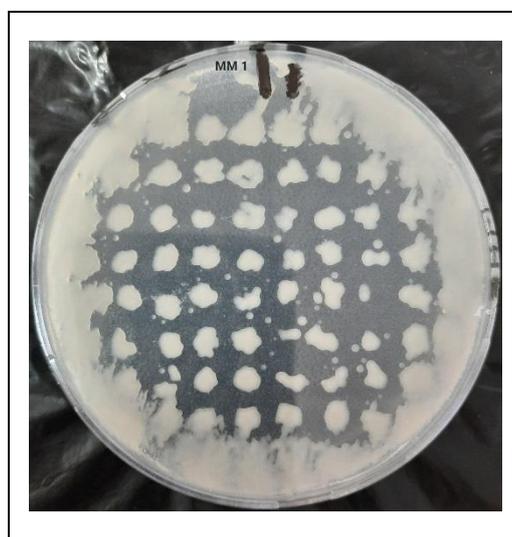


Figure 25 : L’apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM après Répliques sur velours de Master 1.

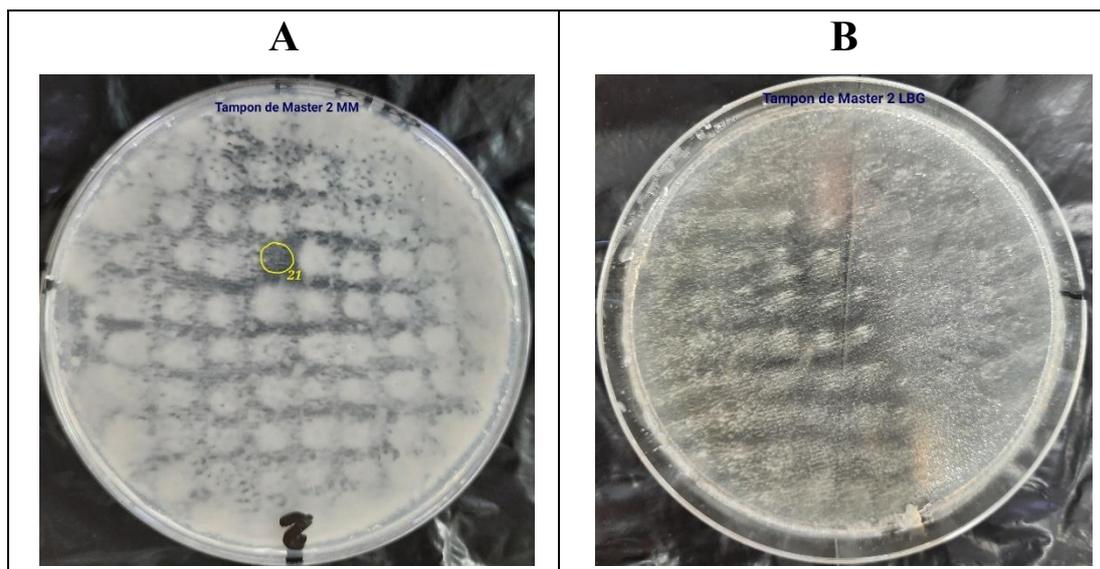


Figure 26 : L'apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM(A) et LB+ gentamicine de concentration 0.4mg/ml (B) après Répliques sur velours de Master 2.

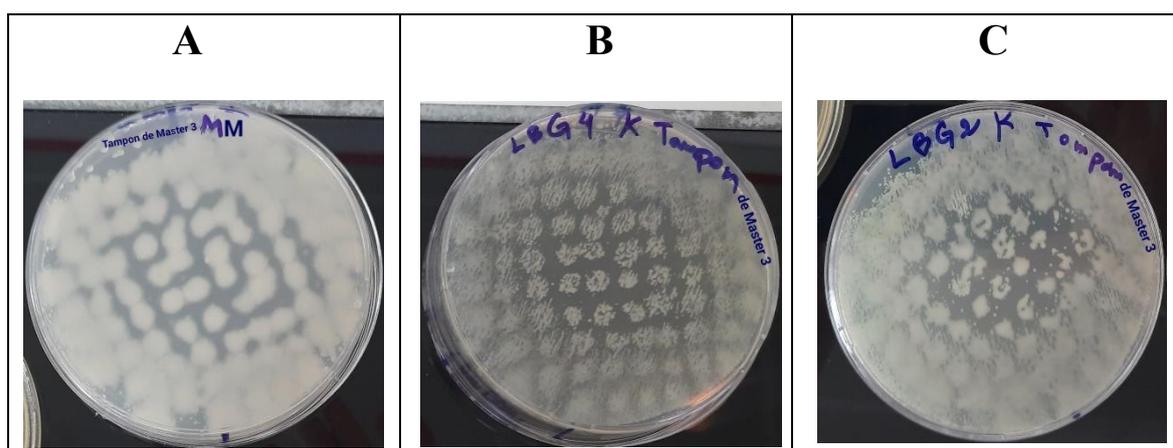


Figure 27 : L'apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM(A) et LB+ gentamicine de concentration 4mg/ml (B) et 2mg/ml(C) après Répliques sur velours de Master 3.

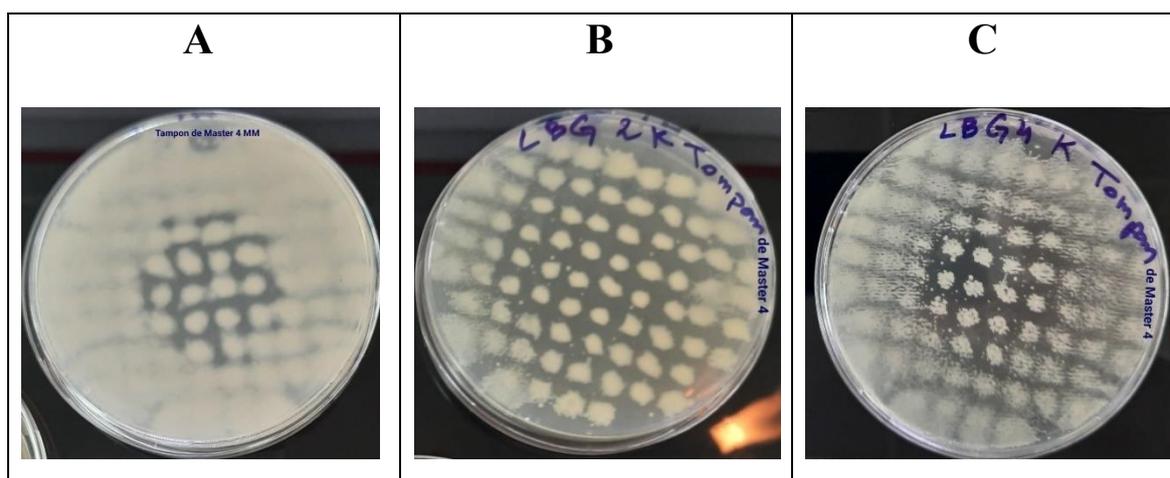


Figure 28 : L'apparition des colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le MM(A) et LB+ gentamicine de concentration 2mg/ml (B) et 4mg/ml(C) après Répliques sur velours de Master 4.

Les colonies Master 1 se sont développées à tous les endroits de la boîte MM. (Figure 25)

Master 2 : la colonie numéro 21 n'apparaissait pas dans la boîte MM, et dans la boîte antibiotique de concentrations 0.4 mg/ml, toutes les colonies apparaissaient. (Figure 26)

Pour les Masters 3 et 4, toutes les colonies se sont multipliées en MM et en LB avec l'antibiotique gentamicine de deux concentrations 2 mg/ml et 4 mg/ml. (Figure 27,28)



Figure 29 : Antibiogramme par disque chez *Staphylococcus aureus* a différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (A) et 2 mg/ml (B)) et de ciprofloxacine (0.25 mg/ml (C)).

La méthode d'immersion des disques dans la gentamicine aux deux concentrations et dans l'antibiotique ciprofloxacine a donné des zones d'inhibition de grand diamètre, indiquant leur sensibilité. (Figure 29)

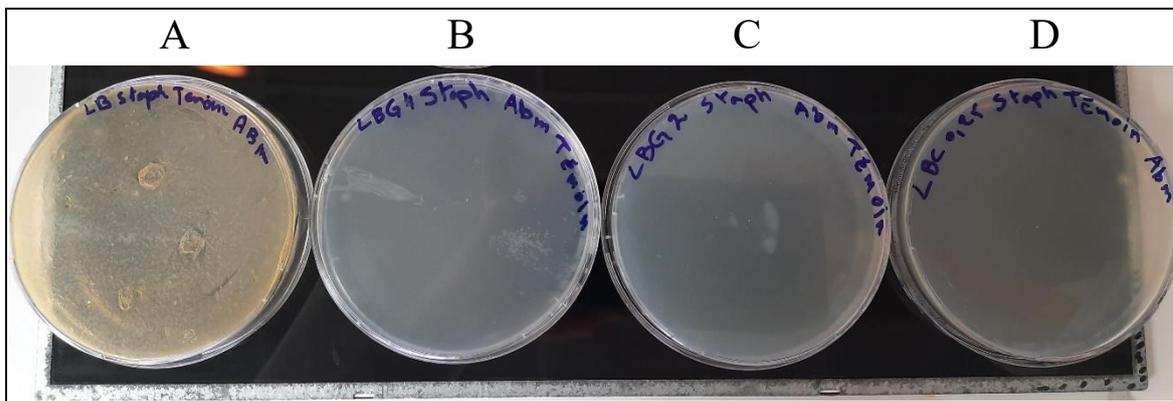


Figure 30 : La croissance bactérienne des colonies de *Staphylococcus aureus* avant l'UV dans LB solide(A) et LB + différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (B)et 2 mg/ml (C)) et de ciprofloxacine (0.25 mg/ml (D)).

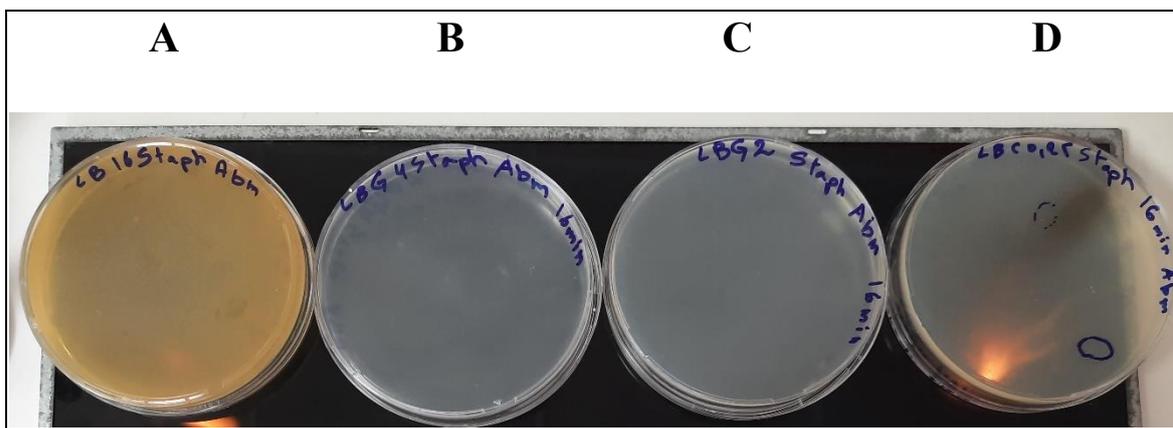


Figure 31 : La croissance bactérienne des colonies de *Staphylococcus aureus* après l'UV dans LB solide(A) et LB + différent concentration de gentamicine (4 mg/ml (B)et 2 mg/ml (C)) et de ciprofloxacine (0.25 mg/ml (D)).

- L'apparition d'un tapis bactérien dans les boîtes exposée aux UV ainsi que celle appartenant au témoin.
- Dans les boîtes de Petri remplies de milieu LB avec de la gentamicine de concentration de 2 et 4 mg/ml et du ciprofloxacine 0.25 mg/ml, aucune colonie n'est apparue ni chez le témoin ni chez ceux exposés aux rayons UV. (Figure 30,31)



Figure 32 : le phénotype de *klebsiella pneumoniae*

Les colonies apparaissent par deux formes : petit(A) et grand(B). (Figure 32)

V. Discussion

La boîte de témoin pour *klebsiella pneumoniae*, qui avait un pourcentage de 100 % par rapport à la boîte exposée aux UV pendant 8 minutes et 16 minutes, dont les pourcentages ont été estimés respectivement à 40 % et 25 %. Le nombre de ses colonies diminua progressivement. Quant aux *Staphylococcus aureus*, une exposition de 16 minutes par rapport au témoin a entraîné une diminution sévère et spectaculaire du nombre de colonies, le taux de boîte exposée au UV étant de 9 %.

Les colonies de *klebsiella pneumoniae* dans le milieu MM sont plus denses que dans le milieu LB, et cela est dû au fait qu'elles s'adaptent aux milieux sans nutriments. Quant au *Staphylococcus aureus*, il n'est pas autotrophe et se reproduit en petite taille et en plus petit nombre dans le LB solide.

Aucune mutation n'a été obtenue dans les boîtes MM sur lesquelles le tampon du Master 1, 3 ou 4 a été appliqué. Quant à la boîte Master 2, il a été évoqué la possibilité de l'existence d'une mutation d'auxotrophie à l'endroit de la colonie n°21, mais après la confirmation, il a été constaté que les velours ne l'atteignaient pas, et donc dans chaque boîte de MM pour chaque Master, aucune mutation n'y apparaissait.

klebsiella pneumoniae a donné des résultats différents dans la technique de l'antibiogramme pour les deux méthodes : sensibilité à une zone d'inhibition de petit diamètre dans les disques de gentamicine à toutes les concentrations et résistance à celle-ci dans le milieu qui y est mélangé. Cela conduit à l'hypothèse qu'il est capable de s'adapter à l'antibiotique dans le LB tout comme il s'est adapté au MM.

L'absence de colonies apparaissant dans les boîtes témoins aux deux concentrations de gentamicine et de ciprofloxacine témoigne de sa sensibilité, et en la comparant avec des boîtes exposées aux UV aux mêmes concentrations, elle a donné des résultats identiques, ce qui ne signifie qu'aucune mutation s'est produite.

La différence de forme des colonies de *Staphylococcus aureus* et *klebsiella pneumoniae* dans les deux boîtes de Petri exposées aux UV pendant 16 minutes et à une dilution de 10⁻⁵ témoigne de la présence d'une mutation phénotypique.

Conclusion et perspectives

Premièrement la technique d'UV et la dilution sont étroitement liées, car elles sont utilisées ensemble pour calculer la mort cellulaire et également pour effectuer la sélection destinée à être utilisée dans les répliques sur velours, ce qui nous offre la possibilité de détecter la mutation.

Deuxièmement plus le niveau de dilution est élevé, plus la taille des colonies pour *Staphylococcus aureus* et plus encore pour *klebsiella pneumoniae* est grande, du fait de la présence d'un espace suffisant du fait de la diminution de leur nombre, ce qui facilite leur sélection.

Troisièmement une exposition aux UV pendant 16 minutes a un effet très significatif sur la destruction des colonies de *Staphylococcus aureus*, bien plus que chez *klebsiella pneumoniae*, et provoque également une modification de leur phénotype.

Quatrièmement, la recherche travaille toujours sur l'utilisation des UV pour prévenir l'infection et stériliser, et il a été confirmé qu'en l'exposant pendant 16 minutes, et même si elle élimine un pourcentage raisonnable des deux bactéries, cela ne suffit pas pour les éliminer complètement, et pour cette raison il est conseillé d'augmenter la durée d'exposition.

Cinquièmement les UV provoquent une modification des bactéries en détruisant une partie de leur ADN, ce qui est bénéfique dans le domaine de la production de médicaments et de cosmétiques, mais cela fait encore l'objet de recherches et d'expérimentations.

Les Références bibliographies

- Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H. 2000. Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2ème édition : 171-211.
- Baerwolf S, Geffers C, Behnke M. 2002. Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. SHEA 216.
- Bailey, R. (2019, August 20). Bacteria shapes. ThoughtCo.
- Cunin R, 1993, Gènes, Mutation, Mutagenèse Et Réparation De L'ADN, In:Génétique Bactérienne,éd.VIGOT, Paris, 43-63
- De Buyser M.L, Sutra L. (2005). Staphylococcus aureus *In*: Federighi M. Bactériologie alimentaire-Compendium d'hygiène des aliments. Economica, Paris, 25-51.
- Despax S, 2014-Complexations de L'ADN Par Des Composés Organoruthénés Et Étude De L'adhésion Cellulaire Sur Des Substrats Mous, Thèse De Doctorat, Université de strasbourg, Strasbourg, 187p
- El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. 2012. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens. PATBIO-3048 ; No. Of Pages 8.
- Étienne J., Clauser E., Housset C., Proingard P, 2006, Structure Et Fonction Des Acides Nucléiques, *In* : Biochimie Génétique Biologie Moléculaire, 9e édition. Elsevier Masson, France, 13-33
- Freney J, R. F., Hansen W, and Bollet TC. 2000. Précis de bactériologie clinique.
- Garrity, G. M., M. Winters, A. W. Kuo, and D. B. Searles. 2001. Taxonomic Outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Release 1.0. ed. Springer-Verlag, New York. [Online.]. <http://141.150.157.80/bergeysoutline/main.htm>
- Genevès L, 1979, Les Procaryotes Et Les Virus. Éléments De Microbiologie, *In* : Biologie Cellulaire, éd. Dunod, Paris, 277-345
- Gokdemir S.F., ARAS S, 2019 - Chemotaxonomy *In* Bacterial Systematics, Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C: Biology, 1, 28, 78-30
- Gottlieb Land W, 2023, Infectious Agents: From the Red Queen Paradigm to Their Genuine Traits, *In*: Damage - Associated Molecular Patterns In Human Diseases, éd. Springer, Switzaland, 47-93

- Gueye O. 2007. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. P27, 28-44.
- Hartl D.L., Jones E.W, 2003, Mécanismes De Mutation Et De Réparation De L'ADN, *In* :Génétique Les Grandes Principes, 3^e édition. Dunod, Paris, 249-286.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560447/box/box001/?report=objectonly>
- Karp G, 2004, Nature Du Gène Et Du Génome, *In* : Biologie Cellulaire & Moléculaire, 2e édition. De Boeck, Bruxelles, 397-438
- La structure de l'ADN ». <https://tp-svt.pagesperso-orange.fr/adn.htm> (consulté le 3 avril 2023).
- Le Loir Y., Gautier M, 2009, Taxonomie Et Habitat, *In* : Staphylococcus aureus, éd. LAVOISIER, France, 1-64
- Le Minor L and Véron M. 1989. Bactériologie médicale, 2^eme édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.2 : 428-432.
- Madigan M.T., Martinko J.M, 2007, Génétique Bactérienne, *In* : Biologie Des Micro-organismes, 11e édition. Pearson Education France, Paris, 257-300
- Minor L and Véron M. 1989. Bactériologie médicale, 2^eme édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.2 :428-432.
- Nauciel C., Vildé J.-L, 2005, Structure Bactérienne, *In* :Bactériologie Médicale, 2^e édition. Masson, Paris, 5-9.
- Neidhardt F.C., Ingraham J. L., Schaechter M, 1994, L'adaptation Génétique : Le Génome Et Sa Plasticité, *In* : Physiologie De La Cellule Bactérienne, éd. Masson, Paris, 228-254.
- Neidhardt F.C., Ingraham J. L., Schaechter M, 1994, Le Cycle Cellulaire, *In* : Physiologie De La Cellule Bactérienne, éd. Massan, Paris, 359-385.
- Neidhardt F.C., Ingraham J. L., Schaechter M, 1994, Structure Et Fonction Des Parties De La Cellule Bactérienne, *In* : Physiologie De La Cellule Bactérienne, éd. Masson, Paris, 28-56
- Neidhardt F.C., Ingraham J. L., Schaechter M, 1994, Structure Et Fonction des Parties De La Cellule Bactérienne, *In* : Physidagic De La Cellule Bactérienne, éd. Massen, Paris, 28-56
- Pierce B, 2012, La Réplication Et La Recombinaison de l'ADN, *In* : L'essentiel De La Génétique, 1^{ère} édition. De Bosck, Bruxelles, 219 242
- Pierce B, 2012, L'ADN : La Nature Chimique Du Gène *In* : L'essentiel De La Génétique, 1^{ère} édition. De Beeck, Bruxelles, 193-214.
- Pierce B, 2012, Les Mutations Géniques, Les Éléments Transposables, Et La Réparation De L'ADN, *In* : L'essentiel De La Génétique, 1^{ère} édition. De Breck, Bruxelles, 321-346

- Pierce B, 2012, Les Systèmes Génétiques Bactériens Et Viraux, *In* : L'essentiel De La Génétique, 1ère édition. De Boeck, Bruxelles, 139-165
- Rolland X., Rolland L, 1997, Les Microbes, *In* : Bactéries, Virus Et Champignons, éd. Flammarion, France, 11-61
- Seck A. Données sur la résistance des souches à l'origine d'infections nosocomiales (1990-2000) au CHU de Dakar Thèse Pharm., Dakar, 2001, n°83
- « Staphylococcus aureus résistant à la méticilline ». 29 juillet 2022. [En ligne]. Disponible sur : <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=7820>
- Vanilssen A., Nilstrem R., Kuslovic A, 2020, Microbiologie Médicale I : Agents Pathogènes Et Microbiome Humain, éd. Cambridge Stanford Books, Royaume-Uni, 641p
- Vincent R, 2007, Fondements De La Génétique, *In* : Génétique Moléculaire, éd. De Bock, Bruxelles, 1-31
- Vincent R, 2007, Les Modalités D'expressions Des Gènes, *In* : Génétique Moléculaire, éd. De Boeck, Bruxelles, 33-75
- Vincent R, 2007, Variabilité Générique, *In* : Génétique Moléculaire, éd. De Boeck, Bruxelles, 77- 105.
 - Willey J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J, 2018, La Structure cellulaire, *In* : Microbiologie de prescott, 5 édition, Rue de Bosquet 7, B-1348 Louvain-la-Neuve, 42-79

Annexe 1

TECHNICAL SHEET
TS 610245
Rev.0 / 01.04.2015
Page 1 of 2

LB Agar

Medium for the cultivation of *Escherichia coli* used in molecular genetic studies.

TYPICAL FORMULA	(g/l)
Enzymatic Digest of Casein	10.0
Yeast Extract	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	15.0
Final pH 7.0 ± 0.2 at 25°C	

DESCRIPTION

LB Agar (Lennox*) is a medium used for maintaining and propagating recombinant strains of *Escherichia coli* in molecular microbiology procedures.

*Three formulations differing in the amount of sodium chloride were developed to provide selection of the optimal salt concentration for a specific strain. Lennox contains half the sodium chloride of the miller formulation and ten times the sodium chloride level of Luria.

PRINCIPLE

Enzymatic digest of casein provides carbon, nitrogen, amino acids and minerals. Yeast extract supplies vitamins and trace elements. Sodium chloride maintains the osmotic balance of the medium. Agar is the solidifying agent.

PREPARATION

Suspend 35.0 g of powder in 1 liter of deionized or distilled water. Bring to boil and shake until completely dissolved. Sterilize at 121°C for 15 minutes. Cool up to 45-50°C. Pour in Petri dishes.

TECHNIQUE

Consult appropriate references for detailed information and recommended procedures.

INTERPRETATION OF RESULTS

Observe colonies on the agar surface.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed and use it before the expiry date on the label or until signs of deterioration or contamination are evident. Store prepared plates at 2-8°C away from light.

WARNING AND PRECAUTIONS

The product does not contain hazardous substances in concentrations exceeding the limits set by current legislation and therefore is not classified as dangerous. It is nevertheless recommended to consult the safety data sheet for its correct use. The product is designed for professional use only and must be used by properly trained operators.

DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to the national and local regulations in force.

REFERENCES

1. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
2. Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
3. Lennox (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology 1:190-206.
4. Luria S.E. and J.W. Burrous (1955) Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. J. Bacteriol 74:461-476.

Distribué par :

Z.A de Gesvrine - 4 rue Képler - B.P.4125
44241 La Chapelle-sur-Erdre Cedex - France
t. : +33 (0)2 40 93 53 53 | f. : +33 (0)2 40 93 41 00
commercial@humeau.com



w w w . h u m e a u . c o m

Annexe 2



Technical Data

Minimal Agar

M512

Minimal Agar is recommended for the isolation and characterization of nutritional mutants of *Escherichia coli*.

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Dextrose	1.000
Dipotassium phosphate	7.000
Monopotassium phosphate	2.000
Sodium citrate	0.500
Magnesium sulphate	0.100
Ammonium sulphate	1.000
Agar	15.000
Final pH (at 25°C)	7.0±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Directions

Suspend 26.6 grams in 1000 ml distilled water. Heat to boiling to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes. Mix well and pour into sterile Petri plates.

Principle And Interpretation

Nutritional mutants of *Escherichia coli* obtained by the exposure of wild type *E. coli* to ultra violet light need a nutritionally complete medium to grow. Minimal media can be supplemented with the desired additives to study nutritional characters of the nutritional mutants. Minimal media are the formulations of Davis (1) as described by Lederberg (2). Minimal media contain the necessary nutrients only for the growth of wild type *E. coli* strains. By the random isolation method described by Lederberg, nutritional mutants derived from irradiated cultures of wild type *E. coli* can be isolated (2). These mutants can also be isolated by the use of penicillin as described by Davis and Lederberg (1). *Bacillus subtilis* mutants can be isolated by these techniques and by the penicillin technique also, as described by Nester et al (3).

Dextrose is an energy source. Dipotassium and monopotassium phosphates provide buffering to the medium. Magnesium sulphate and ammonium sulphate are sources of ions that simulate metabolism.

The nutritional supplements to be added to minimal medium depend upon the type of mutant to be screened as for amino acids, vitamins, nucleic acids or other substances. This can be achieved by addition of vitamin assay casamino acids plus tryptophan or a mixture of water soluble vitamins, yeast or nucleic acid extracts.

A cell suspension of wild type *E. coli* is irradiated and cultured on Minimal Agar supplement with all the necessary growth requirements. This will allow growth of both wild type cells (prototrophs) and mutant cells. The selected colonies are then added to Minimal Broth, Davis (M389) and Minimal Broth Davis supplemented with the growth requirements and incubated at 35°C for 24 hours. Growth in the Minimal Broth supplemented with growth requirements and no growth in Minimal Broth indicates a mutant for that particular factor.

Quality Control

Appearance

Off-white to beige homogeneous free flowing powder

Gelling

Firm, comparable with 1.5% Agar gel

Colour and Clarity of prepared medium

Medium amber coloured clear to slightly opalescent gel forms in Petri plates

Reaction

Reaction of 2.6% w/v aqueous solution at 25°C. pH : 7.0±0.2

Please refer disclaimer Overleaf.

Annexe 3

L'appareil d'UV.



Annexe 4

Incubateur.



Annexe 5

Incubateur agitateur.



Annexe 6

Milieu LB



Milieu MM

