

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Département de Biologie

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Génétique fondamentale et appliquée

Par
DJABER YACINE
&
AIACHI YACINE

Thème :

**Traitement d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*
 par UV : mise en point d'une courbe de mortalité.**

Soutenue le 03/07/2023 devant le jury composé de :

Président	Dalache Fatiha	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	Chibani Abdelwaheb	Pr	Université de Mostaganem
Examinateur	Nébbache Salim	MCA	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

Dédicace

Par le biais de cette dédicace, je souhaite exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont soutenu et inspiré tout au long de mon parcours académique. Ce mémoire de master représente le fruit de nombreuses heures de travail, de réflexion et d'efforts consacrés à approfondir mes connaissances et à explorer un sujet qui me passionne.

Mes remerciements vont à mes proches, ma famille et mes amis qui ont été là à chaque étape de ce voyage leur soutien indéfectible, leurs encouragements constants et leur amour inconditionnel ont été mes piliers durant les moments de doute et de fatigue. Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers mes camarades de classe et mes collègues de laboratoire, qui ont partagé cette aventure académique avec moi.

Avec toute ma reconnaissance, **Djaber Yacine**

Dédicace

Je souhaite dédier ce mémoire à toutes les personnes qui ont joué un rôle important dans mon parcours académique. À mes parents, pour leur amour et leur soutien indéfectibles tout au long de mes études. À mes amis, pour leur présence et leurs encouragements qui m'ont aidé à surmonter les défis. À mes professeurs, pour leur expertise, leur passion et leur dévouement à transmettre le savoir. À mes collègues de classe, pour les moments d'apprentissage partagés et les échanges stimulants. À toutes les personnes qui m'ont inspiré et motivé à donner le meilleur de moi-même, je vous dédie ce mémoire avec gratitude.

Aiachi Yacine

Remerciement

Merci à Dieu, le tout puissant, qui m'a donné la volonté et la patience nécessaires pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de master.

Nous voulons exprimer notre gratitude à notre directeur de mémoire le professeur **Chibani Abdelwaheb** pour son enseignement précieux et ses conseils perspicaces.

Nos remerciements vont également à nos proches et à nos familles pour leur soutien indéfectible et leur compréhension durant cette période exigeante.

Enfin, nous souhaitons exprimer notre reconnaissance envers tous les enseignants, chercheurs et professionnels qui ont partagé leur expertise et nous ont offert des perspectives enrichissantes.

Nous remercions Mme. **Dalache Fatiha** pour avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions Mr. **Nebbache Salim** pour avoir acceptée d'examiner ce travail.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie.

Liste des abréviations

A : Adénosine

ADH : Arginine déshydrogénase.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

ARNt : acide ribonucléique de transfert.

BER : Base excision repair.

BN : Bouillon Nutritive.

C : Cytosine

G: Guanosine

IS: insertion sequences.

KDa: kilo Dalton.

Kpb : kilo paire de bases.

Aw: activity of water

Lac : Lactose.

LD : Lethal Dose.

LDC : Lysine-décarboxylase.

MMR : Mesure de maîtrise de risques.

Mpb : Million paire de bases.

NER: Named Entity Recognition.

NHEJ: Non-Homologous End-Joining.

ODC: Ornithine-décarboxylase.

ONPG: Orthonitrophényl-galactose.

SSB: Single-Stranded Binding.

T : Thymine.

TDA : Tryptophane désaminase.

TSB: Tryptic Soy Broth.

U: Uracile.

UFC : Unités formant des colonies.

UV : Ultra-Violet.

XXe : La période de 1900 à 1999.

SSB: single-strand binding protein

VRBG: Violet Red Bile Glucose

Liste des tableaux

Tableau 1 : Aperçu des bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

Tableau 2 : Caractéristiques culturaux de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 3 : Les agents mutagènes selon leur catégorie.

Tableau 4 : Le nombre de colonies en UFC / ml chez *E coli* après l'exposition à l'UV à différents temps.

Tableau 5 : Le nombre de colonies en UFC / ml chez *Pseudomonas aeruginosa* après l'exposition à l'UV à différents temps.

Liste des figures

Figure 1 : Les Formes De Base De Bactéries.

Figure 2 : *Escherichia coli* observées au microscope électronique (Gx10000)

Figure 3 : Bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure 4 : La structure en double hélice de l'ADN.

Figure 5 : La structure chimique d'un nucléotide.

Figure 6 : Structure d'un chromosome.

Figure 7 : Schéma de mutation faux sens.

Figure 8 : Schéma de mutation non-sens.

Figure 9: Schéma mutation silencieux.

Figure 10: Electromagnetic radiation spectrum with a division of light spectrum on visible and UV light in the three different types.

Figure 11 : Le spectre ultraviolet (UV) (100-400 nm), les gammes de longueurs d'onde correspondantes, leur activité germicide et les risques pour la santé humaine.

Figure 12 : La réparation par excision de bases est l'une des formes les plus simple de réparation de l'ADN.

Figure 13 : Modèle de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER) chez *E. coli*.

Figure 14 : Schéma L'ensemencement des deux isolats *E coli* et *P aeruginosa* dans 3 différentes milieu de culture.

Figure 15 : Schéma de repiquage des colonies.

Figure 16 : Schéma présente le protocole d'Exposition de suspensions au rayon ultraviolet.

Figure 17 : Les tubes de la suspension mère de *E. coli* après l'irradiation de UV.

Figure 18 : Les tubes de la suspension mère de *Pseudomonas aeruginosa* après l'irradiation de UV.

Figure 19 : Protocole de dilution décimale et étalement.

Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies d'*Escherichia coli* sur gélose VRBG.

Figure 21 : Aspect macroscopique des colonies d'*Escherichia coli* sur gélose MacConkey.

Figure 22 : Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose King A.

Figure 23 : La croissance bactérienne d'*Escherichia coli* après l'irradiation par UV a différents déluitions.

Figure 24 : La courbe de mortalité de la souche *Escherichia coli*.

Figure 25 : La croissance bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* après l'irradiation par UV a différents déluitions.

Figure 26 : La courbe de mortalité de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction

CHAPITRE I : LES BACTERIES	3
I.1 HISTORIQUE	3
I.2 DEFINITION	4
I.3 CROISSANCE ET REPRODUCTION	4
I.3.1 Division cellulaire.....	4
I.3.2 Croissance et culture des bactéries.....	4
I.4 STRUCTURE CELLULAIRE.....	5
I.5 MORPHOLOGIE ET ASSOCIATION DES BACTERIES	6
I.6 GENETIQUE	7
I.7 MOBILITE DES BACTERIES	8
I.8 INTERACTION AVEC D'AUTRE ORGANISMES.....	8
I.9 CLASSIFICATION ET IDENTIFICATION DES BACTERIES	9
I.9.1 Historique du classement.....	9
I.9.2 Chimio taxonomie.....	10
I.9.3 Classification génotypique	10
I.9.4 Classification actuelle	10
I.10 LA BACTERIE : <i>ESCHERICHIA COLI</i>	10
I.10.1 Définition	10
I.10.2 Habitat.....	11
I.10.3 Taxonomie.....	11
I.10.4 Caractéristiques bactériologiques	12

I.10.4.1	Caractères morphologiques	12
I.10.4.2	Caractères cultureux	12
I.10.4.3	Les caractères génétiques	13
I.10.4.4	Caractères biochimiques	14
I.11	LA BACTERIE : <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	14
I.11.1	Habitat.....	14
I.11.2	Taxonomie et nomenclature	14
I.11.3	Bactériologie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
I.11.3.1	Caractères morphologiques	15
I.11.3.2	Caractères cultureux	15
I.11.3.2.1	Caractères biochimiques et enzymatiques.....	17
I.11.3.2.2	Caractères antigéniques	17
I.11.3.2.3	Caractères génomiques	17

CHAPITRE II: ADN ET MUTAGENESE18

II.1	ADN	18
II.1.1	Définition de l'ADN	18
II.1.2	Acides nucléiques : Les molécules clés de l'information génétique	18
II.1.3	Le rôle de l'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	25
II.1.8	Réplication de l'ADN.....	25
II.1.8.1	Processus de la réplication de l'ADN	25
II.1.9	Rôle des enzymes dans la réplication.....	26
II.2	MUTATIONS DE L'ADN.....	26
II.2.1	Définition de mutation	26
II.2.2	Mutagenèse dirigée	26

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	29
II.2.3.6	Mutation suppressive	29
II.2.3.7	Mutation létale conditionnelle	29
II.2.3.8	Mutation d'inversion	29
II.2.4	Les agents mutagènes.....	30
II.2.4.1	Les agents physiques	30
II.2.4.1.1	Rayonnement non ionisant (UV)	30
II.2.4.1.2	Rayonnement ionisant (rayons X)	32
II.2.4.2	Les agents chimiques	32
II.2.4.2.1	Les analogues de bases	32
II.2.4.2.2	L'acide nitreux	33
II.2.4.2.3	Les agents intercalants	33
II.2.4.2.4	Les agents alkylants	33
II.2.4.3	Les agents biologiques	34
II.2.4.3.1	Les transposons	34
II.2.5	Les mécanismes de réparation des mutations dans l'ADN	34
II.2.5.1	La réparation par excision de la base (BER)	35
II.2.5.2	Réparation par excision de nucléotides (NER).....	36
II.2.5.3	Réparation des mésappariements.....	37
II.2.5.4	Réparation par recombinaison homologue.....	37
II.2.5.5	Réparation par recombinaison non homologue (NHEJ)	38

III.MATERIEL ET METHODES.....39

III.1	PROBLEMATIQUE.....	39
III.2	CADRE D'ETUDE.....	39
III.3	ORIGINE DES ISOLATS.....	39
III.4	LES MILIEUX DE CULTURES	39
III.4.1	Les milieux solides	39
III.4.2	MacConkey	40

III.4.3 VRBG.....	40
III.4.4 King B.....	40
III.5 LES MILIEUX LIQUIDES	41
III.5.1 Bouillon King A	41
III.5.2 Bouillon nutritive.....	41
III.6 TECHNIQUE D'ETUDE	41
III.6.1 L'ensemencement.....	41
III.6.2 Le repiquage	42
III.6.3 Exposition au rayon ultraviolet.....	45
III.6.4 Dilution et étalement	48
IV.RESULTATS	50
IV.1 ASPECT MACROSCOPIQUE.....	50
IV.2 L'EFFET DE L'UV SUR LA SURVIE DES ISOLATS	51
V.DISCUSSION	56
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	58

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Ce mémoire se concentre sur l'impact des rayons ultraviolets (UV) sur deux bactéries courantes dans l'environnement et dans le domaine médical, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les rayons UV ont la capacité d'endommager l'ADN des organismes vivants, ce qui peut inactiver les bactéries et diminuer leur viabilité.

Dans cette étude, deux isolats d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* ont été exposés au rayonnement ultraviolet pendant différentes périodes de temps afin d'établir une courbe de mortalité pour les deux souches.

Nos résultats ont montré que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, les deux espèces, sont sensibles aux rayons ultraviolets. Le traitement aux UV a réduit considérablement le nombre de colonies viables des deux bactéries, ce qui suggère une action bactéricide efficace.

Le rayonnement ultraviolet est l'un des facteurs physiques qui provoquent des mutations. Cette étude était basée sur des examens à l'œil nu. Les résultats ont montré une différence dans la croissance des colonies bactériennes avec l'augmentation du temps d'exposition aux rayons ultraviolets.

Mots clés : rayons ultraviolets, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, désinfection, inactivation bactérienne, ADN, viabilité cellulaire.

Summary

This thesis focuses on the impact of ultraviolet (UV) rays on two common bacteria in the environment and in the medical field, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. UV rays have the ability to damage the DNA of living organisms, which can inactivate bacteria and decrease their viability.

In this study, two isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were exposed to ultraviolet radiation for different periods of time in order to establish a mortality curve for the two strains.

Our results showed that *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, both species, are sensitive to ultraviolet rays. UV treatment significantly reduced the number of viable colonies of both bacteria, suggesting effective bactericidal action.

Ultraviolet radiation is one of the physical factors that cause mutations. This study was based on naked eye examinations. The results showed a difference in bacterial colony growth with increasing UV exposure time.

Keywords : ultraviolet rays, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, disinfection, bacterial inactivation, DNA, cell viability.

ملخص

تركز هذه الأطروحة على تأثير الأشعة فوق البنفسجية على نوعين من البكتيريا الشائعة في البيئة وفي المجال الطبي، الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية. للأشعة فوق البنفسجية القدرة على إتلاف الحمض النووي للكائنات الحية، والتي يمكن أن تعطل البكتيريا وتقليل قدرتها على البقاء.

في هذه الدراسة، تعرضت عزلتان من الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية للأشعة فوق البنفسجية لفترات زمنية مختلفة من أجل إنشاء منحنى معدل الوفيات للسلاطين.

أظهرت نتائجنا الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية، كلا النوعين، حساسان للأشعة فوق البنفسجية. قلل العلاج بالأشعة فوق البنفسجية بشكل كبير من عدد المستعمرات القابلة للحياة لكل من البكتيريا، مما يشير إلى عمل فعال للجراثيم.

الأشعة فوق البنفسجية هي أحد العوامل الفيزيائية التي تسبب الطفرات. استندت هذه الدراسة إلى فحوصات العين المجردة. أظهرت النتائج اختلافاً في نمو الطائفة البكتيرية مع زيادة وقت التعرض للأشعة فوق البنفسجية.

الكلمات المفتاحية: الأشعة فوق البنفسجية، الإشريكية القولونية، الزائفة الزنجارية، التطهير، تثبيط البكتيريا، الحمض النووي، حيوية الخلية.

INTRODUCTION

Toutes les cellules vivantes doivent maintenir l'intégrité de leur information génétique afin de fonctionner normalement. La stabilité génomique est assurée par plusieurs voies de réparation qui neutralisent les conséquences graves des lésions de l'ADN causées par une variété de génotoxines endogènes ou exogènes. **(Sarasin, 1994)** La mutation est le processus d'émergence d'une mutation au niveau de l'ADN. Elle peut être naturelle ou artificielle. Dans la nature, ce processus peut être à l'origine de cancers, de maladies génétiques ou d'innovations évolutives et est le principal responsable de la biodiversité des espèces. Et certaines mutations ont un effet sur la survie des organismes vivants, La lumière ultraviolette à de puissants effets génotoxiques pour produire des dommages à l'ADN, induire des mutations et, dans le pire des cas, provoquer le développement de tumeurs. La principale source naturelle d'UV est le soleil, et les UV solaires sont connus pour être l'une des principales causes de cancers de la peau chez l'homme. **(Setlow, 1974 ; Brash et al., 1991)** Les rayons ultraviolets constituent une région du champ électromagnétique spectre (100-400 nm) qui se produit entre l'extrême de la région visible et les bandes de rayons X. La région UV peut être systématiquement divisée en trois régions spectrales différentes en fonction de leur longueur d'onde et de leur énergie : région UVA (315–400 nm), région UVB (280–315 nm) et région UVC (100–280 nm). **(Bhardwaj et al., 2021)** Dans les blocs opératoires médicaux, Le rayonnement UV est une méthode de contrôle des infections. La lumière UV est utilisée pour stériliser les salles d'opération et les salles de chirurgie instruments, ce qui réduit le risque de plaie chirurgicale contaminations et infections postopératoires. Selon une étude menée par Duke Université Médicale Center et l'Université de Caroline du Nord Health Care, dans laquelle 229 surfaces environnementales ont été échantillonnées chambres de 39 patients sur une période de 15 mois, infection les taux dans les environnements médicaux ont été réduits de 10 % à 0,24 % à l'aide d'une lampe UV-C **(Kodoth et Jones, 2015)**. Les rayons UV arrivent à altérer la structure de l'ADN des cellules, et à produire des mutations aboutissant à terme à la transformation cancéreuse de la cellule, avec une susceptibilité génétique importante. Ainsi, le rayonnement UV induit des mutations tels que les décalages de cadre, les substitutions de bases, les délétions, la recombinaison et d'autres types de réarrangements génétiques **(Schaaper et al., 1987)**. Dans cette étude, deux souches différentes de bactéries ont été exposées au rayonnement ultraviolet pendant des périodes de temps différentes (0, 30s, 1min ,2min, 4min, 8min, 12min ,16min), Ces deux souches sont *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*

- Question de recherche :

Quelle est l'influence de l'exposition aux rayons UV sur la fréquence observée chez les bactéries ?

- Le contenu de ce mémoire est organisé en cinq chapitres :

Les deux premiers chapitres présenteront une brève revue de littérature sur les bactéries, l'ADN et la mutagenèse, ainsi qu'une étude spécifique sur les bactéries utilisées dans cette recherche, à savoir *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Le quatrième chapitre présentera les résultats de nos recherches.

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

Enfin, une conclusion générale sera proposée pour conclure."

CHAPITRE I

Les Bactéries

I.1 Historique

Il y a près d'un demi-millénaire, la science a fait un grand bond en avant avec la découverte du microscope. Avant son existence, on postulait que de « petites créatures », trop petites pour être vues à l'œil nu, existaient cependant, ce n'est qu'avec la découverte du microscope que cela a pu être démontré.

Deux hommes sont aujourd'hui crédités de la découverte de micro-organismes à l'aide de microscopes primitifs : Robert Hooke qui a décrit les structures de fructification des moisissures en 1665 et Antoni van Leeuwenhoek qui est crédité de la découverte des bactéries en 1676. De nombreuses années plus tard, l'émergence et la progression de la discipline de la microbiologie ont pu résoudre deux énigmes importantes qui avaient prévalu en science : l'existence de la génération spontanée et la nature des maladies infectieuses. On pensait que la génération spontanée de bactéries et d'autres organismes était le processus moteur de la putréfaction. Ceci, cependant, a été démystifié par Louis Pasteur dont les recherches sur la stérilisation ont clairement indiqué que ce n'était pas le cas.

Les recherches de Robert Koch, surnommées les "postulats de Koch", ont démontré que les maladies infectieuses étaient causées par des micro-organismes et ont donc mis en lumière la nature des maladies infectieuses. L'impact de l'émergence de la microbiologie est monumental, non seulement en raison de l'étendue des connaissances que nous avons acquises grâce à sa découverte, mais aussi en termes de prospérité accrue des humains qui s'est produite grâce à notre compréhension de ces « petites créatures »."Pour mettre cette dernière affirmation en perspective : en 1900, les trois principales causes de décès étaient la grippe/pneumonie, la tuberculose et la gastro-entérite, alors qu'en 2000, les principales causes de décès étaient les maladies cardiaques, le cancer et les accidents vasculaires cérébraux. Cela représente une étiologie des décès étonnamment différente et il sera intéressant de voir comment ces tendances continuent de changer. (Nouri, 2011).

I.2 Définition

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires. Elles sont capables de se reproduire de manière autonome à la différence des virus qui ont besoin de détourner la machinerie d'une cellule pour se reproduire. La taille des bactéries varie de 1 à 10 μm , et elles pèsent de l'ordre de 10-12 grammes. Elles sont présentes partout, on connaît quelques 8 000 espèces mais on estime qu'il en existerait 100 à 1000 fois plus.

Ce sont des petits sacs de molécules séparés de l'environnement extérieur. Cet ensemble a la capacité remarquable de se copier à l'identique en puisant énergie et réactifs primaires dans le monde extérieur. (Cottinet, 2013). Elles peuvent également être utilisées dans des applications industrielles, telles que la production d'enzymes, d'antibiotiques et d'autres composés chimiques. (Madigan, 2018)

I.3 Croissance et reproduction

I.3.1 Division cellulaire

La division cellulaire bactérienne est un processus fondamental qui permet aux bactéries de se reproduire et de se multiplier. Elle se déroule selon un mécanisme appelé division cellulaire binaire. (Gooper, 2000).

La cellule mère transmette aux deux cellules « filles » qu'elle produit l'information génétique représentée ici par un seul chromosome, qui est une molécule d'ADN circulaire. La situation des cellules eucaryotes est plus complexe. Leur noyau renferme la majorité de l'information génétique sous forme de deux à plusieurs dizaines de chromosomes, chacun pouvant être présent en un (cellules haploïdes) ou deux (cellules diploïdes) exemplaires, qui devront être transmis aux cellules filles. Un mécanisme universel, la mitose assure chez les eucaryotes la répartition rigoureusement équivalente du matériel génétique nucléaire entre les deux cellules filles. (Picaird, 2023).

I.3.2 Croissance et culture des bactéries

Au laboratoire, les bactéries peuvent être cultivées en milieu de culture liquide ou en milieu solide. Le milieu de culture doit apporter les éléments nutritifs ou nutriments élémentaires à la bactérie. Les milieux de culture gélosés solides sont utilisés pour isoler des cultures pures de cellules bactériennes. Dans le cas des bactéries se divisant rapidement, une cellule bactérienne dispersée sur un milieu gélosé va se multiplier et au bout de 24 à 48 heures, devenir un amas de bactéries, appelé une colonie bactérienne, visible à l'œil nu.

Le temps de génération correspond donc au temps nécessaire pour qu'une population de cellules double en nombre. Ce temps est très variable selon les espèces de bactéries et les conditions environnementales. Au laboratoire, dans des conditions idéales, il est par exemple de 20 minutes pour *E. coli*, 100 minutes pour *Lactobacillus acidophilus*, 1 000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*. (**Monod, 1949**).

La croissance d'une population bactérienne dans un milieu de culture liquide non renouvelé, peut être observée dans le temps. Les cellules se divisent, et leur nombre augmente avec le temps. Si on relève le nombre de bactéries à différents intervalles au cours de la croissance, on obtient une courbe de croissance. Elle présente quatre phases principales :

La phase de latence correspond à une période d'adaptation de la bactérie au milieu. Au cours de la phase de croissance exponentielle, les bactéries se développent de façon maximale avec un taux de croissance maximal et constant.

Après une phase transitoire de ralentissement, le nombre de bactéries n'évolue plus : c'est la phase stationnaire. Les divisions bactériennes qui se font encore sont compensées par la mort de bactéries.

La dernière phase est la phase de mortalité ou de déclin. Les bactéries ne se divisent plus, elles meurent et peuvent être lysées. Le milieu de culture n'apporte plus les conditions nécessaires au développement des bactéries. On observe une courbe de décroissance exponentielle progressive (**Techno-Science.net, 2023**).

I.4 Structure cellulaire

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes distincts en fonction de la rétention de la coloration de Gram due à la structure de la paroi cellulaire. Cette méthode de coloration a été initialement développée en 1882 par 'Hans Christian Gram' pour distinguer certaines bactéries. Les bactéries avec une épaisse couche de peptidoglycane entourant la membrane plasmique conservent la coloration de Gram et sont donc appelées Gram-positives. Les bactéries avec une fine couche de peptidoglycane entre une membrane externe et la membrane plasmique interne perdent la coloration de Gram après le lavage et sont appelées Gram-négatives. Cette distinction peut être appliquée à la plupart des bactéries courantes, dont quelques exemples sont illustrés dans le (**tableau 1**) avec un résumé des différences entre les organismes.

Tableau 1: Aperçu des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. (Moriarty et Richards, 2017).

	Gram-positive	Gram-négative
Couleur après coloration de Gram et Safranine	Bleu foncé/violet	Rouge/rose
Caractéristiques de la paroi cellulaire	<p>Couche épaisse de peptidoglycane</p> <p>Pas de membrane externe</p> <p>Des acides téichoïques chargés négativement sont souvent présents</p>	<p>Fine couche de peptidoglycane entourée de périplasme</p> <p>Membrane externe avec lipopolysaccharides et protéines</p> <p>Pas d'acides téichoïques</p>
Exemples	<p>Staphylococcus aureus</p> <p>Streptococcus mutans</p> <p>Staphylococcus epidermidis</p>	<p>Pseudomonas aeruginosa</p> <p>Escherichia coli</p> <p>Salmonella typhimurium</p>

I.5 Morphologie et association des bactéries

Différents types de microbes ont des formes différentes, mais caractéristiques. Dans des conditions appropriées, la forme et la taille des microbes sont relativement stables. Il est important de connaître la structure morphologique des microbes, car elle nous permet de mieux comprendre la physiologie microbienne, les mécanismes pathogènes, les caractéristiques antigéniques et nous permet de les identifier par espèce. De plus, la connaissance de la morphologie microbienne peut être utile pour diagnostiquer la maladie et prévenir les infections microbiennes :

Les bactéries sont des microbes complexes et très variables. Ils se présentent sous quatre formes de base : sphérique (Cocci), en forme de bâtonnet (bacille), en forme d'arc (Vibrio) et en spirale (spirochète) (Figure 1) (Atlas of Oral Microbiology, 2015).

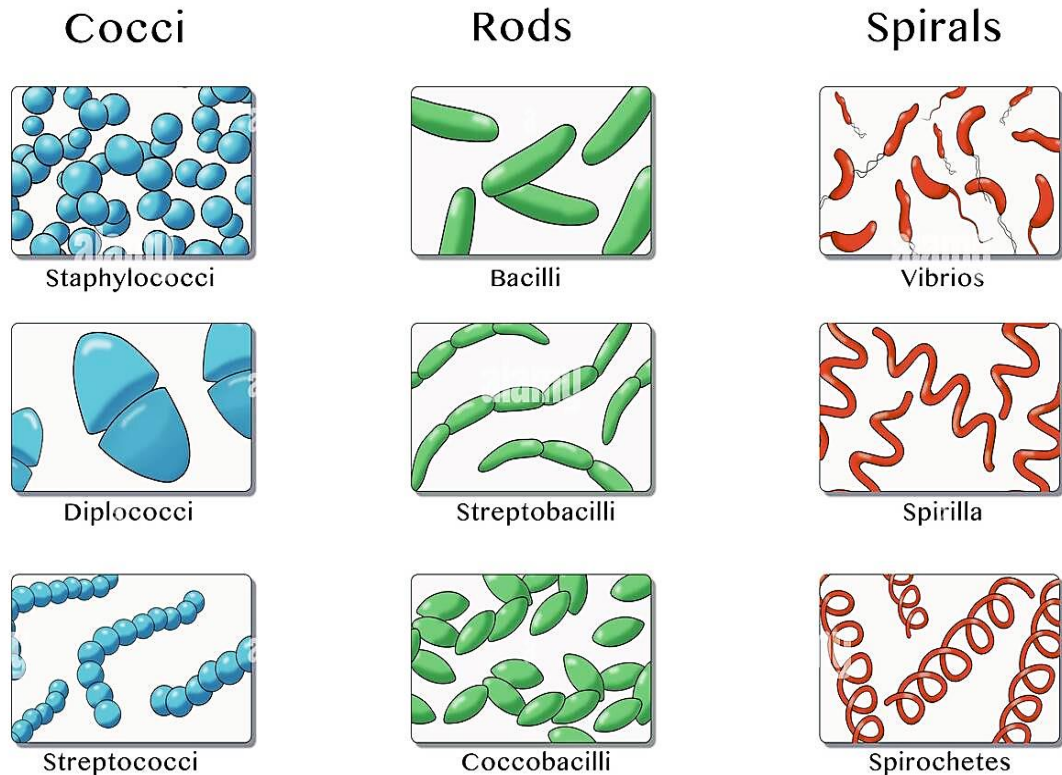


Figure 1 : Les Formes De Base De Bactéries. (Limited, n.d.)

I.6 Génétique

La génétique des bactéries est très différente de celle des organismes supérieurs. Premièrement, les bactéries sont généralement haploïdes, avec une copie de chaque gène sur un seul chromosome circulaire. Deuxièmement, le transfert de gènes dans les bactéries est normalement unidirectionnel. Autrement dit, une cellule donneuse transfère des gènes à une cellule réceptrice plutôt que deux cellules partageant des informations génétiques pour générer une progéniture comme dans les organismes supérieurs.

- Le transfert de gènes dans les bactéries se produit par l'un des trois mécanismes majeurs qui forment les sujets principaux.
- La transformation est un transfert de gène par de l'ADN nu sans implication de contact cellulaire.
- La transduction est un transfert de gène par de l'ADN empaqueté à l'intérieur de particules virales.

- La conjugaison implique un contact cellulaire. Les plasmides, et parfois les chromosomes bactériens, sont transférés entre deux cellules lors de l'accouplement bactérien.

Récemment, il est devenu possible de synthétiser artificiellement des chromosomes bactériens entiers et de les réintroduire dans les cellules bactériennes correspondantes. Cela ouvre la voie à une meilleure ingénierie génétique des bactéries. (Clark *et al.*, 2019).

I.7 Mobilité des bactéries

Les flagelles sont des structures clés concernées par la motilité bactérienne. Néanmoins, les bactéries dépourvues de flagelles peuvent encore être mobiles. Un type de motilité de glissement peut être atteint par le mouvement flexible de toute la cellule. Ceci est principalement observé sur les milieux solides, alors que le mouvement flagellaire est commun aux milieux liquides. Les flagelles peuvent être localisés individuellement à un pôle cellulaire (flagelles monotriches), aux deux pôles (flagelles amphitriches), en grand nombre sur toute la longueur de la cellule (flagelles péritriches) ou sous forme de touffe de flagelles à une extrémité polaire (flagelles lophotriches). Ils ont généralement un aspect ondulé et mesurent environ 10 à 15 nm de diamètre et 2 à 15 µm de longueur. Les flagelles sont composés de sous-unités d'une protéine de faible poids moléculaire, la flagelline (20–40 kDa) disposées de manière hélicoïdale. La partie filamenteuse du flagelle s'étend vers l'extérieur à partir de la surface bactérienne et est ancrée à la bactérie par son corps basal. Il s'agit d'une série de structures protéiques en forme d'anneaux qui maintiennent le flagelle dans la paroi cellulaire bactérienne. Bien qu'il ait été suggéré que le bas de cette structure basale du corps pénètre à travers la membrane cytoplasmique dans le cytoplasme, la relation structurelle exacte entre le corps basal et le peptidoglycane de la paroi cellulaire reste incertaine une courte région de crochet agit comme une connexion entre le long filament externe et le corps basal, ce dernier étant responsable du mouvement flagellaire. (Hobot, 2015)

I.8 Interaction avec d'autres organismes

Les interactions microbiennes sont cruciales pour l'établissement et le maintien réussis d'une population microbienne. Ces interactions se produisent par la reconnaissance environnementale suivie du transfert d'informations moléculaires et génétiques qui incluent

de nombreux mécanismes et classes de molécules. Ces mécanismes permettent aux microorganismes de s'établir dans une communauté, ce qui, en fonction de l'interaction multitrophique, pourrait entraîner une grande diversité. Le résultat de cette interaction multiple est fréquemment lié à un effet pathogène ou bénéfique pour un hôte. Chez l'homme, par exemple, la communauté microbienne joue un rôle important dans la protection contre les maladies causées par des pathogènes microbiens ou des perturbations physiologiques. Les communautés microbiennes des sols jouent également un rôle majeur dans la protection des plantes contre les maladies et les stress abiotiques ou dans l'augmentation de l'absorption des nutriments (**Barga *et al.*, 2016**).

I.9 Classification et Identification des bactéries

La classification et l'identification des bactéries sont des processus importants dans le domaine de la microbiologie. Ces méthodes permettent de caractériser les différentes espèces bactériennes et de les regrouper en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques.

Actuellement, il n'y a pas de classification officielle des bactéries disponible. De nombreux bactériologistes pensent que le Manuel de Bergey représente la classification officielle, mais c'est un malentendu, contrairement à la nomenclature bactérienne où chaque taxon a un nom valide. Le plus proche d'un système de classification officiel est celui qui est largement accepté par la communauté.

I.9.1 Historique du classement

Les premiers essais de classification des microorganismes remontent aux travaux de Muller en 1773 qui les répartissaient en deux groupes différents, Vibrio et Monas sur des critères de mobilité. Par la suite, l'invention de la coloration de Gram en 1883 a permis de diviser le monde bactérien en bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif. (**Alauzet, 2009**)

Ferdinand Cohn (1828-1898) est connu pour ses travaux sur la classification des bactéries et l'établissement de principes de base pour la taxonomie bactérienne. Il a proposé la distinction entre les bactéries à forme de bâtonnet (bacilles) et les bactéries sphériques (Cocci), ainsi que l'utilisation de caractéristiques physiologiques et morphologiques pour classer les bactéries. (**Breed, 1957**).

I.9.2 Chimio taxonomie

La composition chimique des constituants cellulaires est une propriété utile pour améliorer la classification et l'identification des procaryotes. Les méthodes chimio taxonomiques sont largement utilisées, en particulier pour les groupes de procaryotes où les caractères morphologiques et physiologiques ont largement échoué ou n'ont pas été suffisants pour fournir une classification satisfaisante. (**Schleifer et Stackebrandt, 1983**).

I.9.3 Classification génotypique

16S, ainsi que 23S, les comparaisons de séquences de gènes d'ARNr sont actuellement considérées comme l'étalon-or pour déduire les relations phylogénétiques des procaryotes. Ces gènes remplissent toutes les propriétés de marqueurs moléculaires utiles (ubiquitaires, fonctionnellement constants, conservés, homologues). Ce sont des marqueurs stables et moins sujets au transfert latéral de gènes. Il existe également une bonne congruence pour le modèle de ramification des arbres phylogénétiques dérivés de gènes conservés, principalement informatifs. (**Ciccarelli et al., 2006**).

I.9.4 Classification actuelle

Il faut souligner qu'il n'existe toujours pas de système officiellement reconnu pour la classification des procaryotes. Les systèmes de classification actuellement appliqués reposent pour des raisons pratiques sur des méthodes et non sur des concepts théoriques. Le système le plus utilisé est l'approche dite polyphasique. (**Vandamme et al., 1996**), Cette approche comprend des données phénotypiques, chimio taxonomiques et génotypiques, ainsi que des informations phylogénétiques. Le séquençage du gène de l'ARNr 16S est appliqué pour déterminer la phylogénétique. (**Wayne et al., 1987**).

I.10 La bactérie : *Escherichia coli*

I.10.1 Définition

Escherichia coli nommé aussi "colibacille" découverte par le pédiatre allemand autrichien {**Theodor Esherich**} à partir d'un échantillon de selles humaines en 1885. C'est un bacille d'environ 2-3 μm de long et 0,6 à 0,7 μm de diamètre, Gram négatif, non sporulée, souvent mobile, de la famille des Enterobacteriaceae, hôte commun du tube digestif des humains et des animaux.

Le genre d'*Escherichia* est composé de cinq espèces : *E. albetii*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulnérans*, avec *E. coli* comme espèce-type. Sur la base de ses antigènes de surface (O somatique, antigène flagellaire H et antigène capsulaire K), *E. coli* se différencie en plus de 190 sérogroupes (Amairi, 2021).

I.10.2 Habitat

E. coli est une bactérie commune de la microflore commensale intestinale de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Elle colonise de manière asymptomatique le tractus digestif de l'homme dans les premières heures qui suivent la naissance et constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la flore anaérobie facultative du colon humain, sa niche écologique se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon où elle assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse. La concentration en *E. coli* par grammes de selles varie d'un individu à un autre de 10^7 à 10^9 unités formant des colonies (UFC). Elle est plus faible chez les autres mammifères, *E. coli* peut transiter dans l'eau et les sédiments. Il est utilisé comme un indicateur de la contamination fécale de l'eau. On estime que la moitié de la population totale des *E. coli* réside au niveau de ces habitats secondaires environnementaux, au sein desquels certaines souches peuvent être sélectionnées et disséminer naturellement, *E. coli*, et plus largement les coliformes thermotolérants, sont également recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale. (Pantel, 2015).

I.10.3 Taxonomie

Écrit pour la première fois en 1885 par Théodore Escherich qui avait connu *Bacterium coli* en 1895 par Migula, le nom d'*Escherichia coli* dans la famille des Enterobacteriaceae qui fait partie de sa famille tourna *Escherichia coli*. Protéobactéries y rattachées aux sous règnes des protéobactéries, du règne des bactéries. (Bergey et Holt, 1994). *E. coli* est une espèce anaérobie facultative qui présente un microscopie optimisant avec un bâtonnet de 2 à 6 µm de long sur 1,1 à 1,5 µm de large. C'est un firmicute de coloration Gram négative, dont les plus proches parents au niveau génétique sont les bactéries des espèces *Shigella* (que certains bactériologistes sont inclus d'ailleurs en tant que sous-espèce du genre *Escherichia*), *Klebsiella* et *Citrobacter*. (Prescott *et al.*, 2005)

I.10.4 Caractéristiques bactériologiques

I.10.4.1 Caractères morphologiques

E. coli est un bacille de forme cylindrique (bâtonnet) ou Cocco bacillaire, Gram négatif uniformément coloré, non sporulé, parfois capsulé, de 2 μ m à 3 μ m de long sur 0,7 μ m de large. Les cellules de *E. coli* se présentent soit seules ou groupées, le plus souvent par deux (diplobacilles), très rarement elles sont rencontrées en amas ; elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche. Les colonies ont un aspect bombé, lisse et rond (**Grosjean et Pasquier, 2009**).



Figure 2 : *Escherichia coli* observées au microscope électronique (Gx10000) (**Goubau et Pellegrini, 2000**).

I.10.4.2 Caractères cultureux

E. coli est une bactérie mésophile, son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C). La limite de croissance inférieure se situe aux environs de 7°C (**Hanes, 2003**). Les *E. coli* sont tués rapidement lorsque la température dépasse 70°C, comme dans le processus de pasteurisation. Outre la température, le pH et l' a_w peuvent aussi influencer la multiplication d'*E. coli* dont l'optimum de croissance est de 7,2 et 0,99 respectivement. La croissance d'*E. coli* est arrêtée à des pH extrêmes (<3,8 ou >9,5) et à une valeur d' a_w inférieure à 0,94. Le degré d'acidité d'un produit peut donc constituer un facteur de protection pour sa sécurité, (**Anonymous, 1996**). *E. coli* se multiplie rapidement sur gélose ordinaire ou sélective, après 18 à 24 heures donne des colonies de 2 mm de diamètre. Le dédoublement de cellule a lieu toutes les 20 mn (**Cohien et Karib, 2006 ; Jean et al., 2007**).

I.10.4.3 Les caractères génétiques

Le chromosome bactérien occupe un territoire cytoplasmique (0,5 μ m). Il est structuré en superhélice, comportant 50 lobes chez *Escherichia coli* et est relié à la membrane plasmique au moins par 20 points d'attaches. Il est constitué d'une grande molécule d'ADN double brin circulaire. L'une des souches d'*E. coli* la mieux caractérisée est la souche K12 utilisée comme outil de travail dans la recherche scientifique, dans des études de génétique, de biologie moléculaire, de physiologie, et de biochimie. Son génome a été publié en 1997, il correspond à un unique chromosome circulaire de 4,6 millions paires de bases, sur lequel sont identifiés 4289 gènes codant des protéines, 86 gènes codant des ARNt et 22 gènes codant des ARNr rassemblés dans 7 opérons ribosomiaux.

Le génome de la souche *E. coli* pathogène aviaire O1 : K1 :H7 a été publié en 2007 il comprend un chromosome circulaire de 5,1 Mpb et 4 plasmides totalisant ainsi un génome d'une taille de 5,6 Mpb. Le chromosome de la souche aviaire O:78 séquencé en 2013 a une taille de 4,7Mpb avec deux plasmides de 217Kpb et 113Kpb. La comparaison entre les différents génomes des souches *E. coli* a mis en évidence la présence de deux fonds génomiques principaux ; « le cœur génomique » présent dans toutes les souches d'*E. coli* et qui comprend pas moins de 2000 gènes et le fond dérivé ou « génome accessoire », très différent entre les souches, qui permet l'expression de facteurs de virulence provoquant des maladies plus sévères. Le répertoire total de gènes de l'espèce est estimé, à plus de 16 000 et seulement 1% des gènes connus sont communs à toutes les souches d'*E. coli*. Les souches pathogènes d'*E. coli* possèdent jusqu'à 20% d'informations génétiques supplémentaires acquises vraisemblablement au cours de transferts horizontaux d'ADN. De nombreux gènes nouvellement acquis sont localisés sur le chromosome, mais beaucoup d'autres sont sur des réplicons extra-chromosomiques, les plasmides. Au cours de l'évolution, ces gènes peuvent s'intégrer dans des structures relativement indépendantes, comme les transposons ou les phages ou se regrouper pour former des îlots de pathogénicité. La séquence complète du génome de plusieurs souches d'*E. coli* montre la présence de nombreuses séquences d'insertion (IS), de séquences Bactério-phagiques ainsi que d'autres plages de séquences inusuelles qui témoignent de l'extraordinaire plasticité du génome de ce genre bactérien. La variabilité génétique retrouvée chez *E. coli* est due à la grande plasticité qui caractérise leur génome. Elle se traduit par la capacité de ce dernier à moduler ces caractéristiques de façon naturelle, soit spontanée soit en réponse à un stimulus environnemental ce qui engendre des variations structurelles du génome à plus ou moins grande échelle. Cette plasticité

génomique est à la base de l'acquisition et la sélection de gènes de virulence, envers des recombinaisons et des transferts génétiques non spécifiques. (Meguenni, 2016).

I.10.4.4 Caractères biochimiques

E. coli possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces galeries permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic (Diassana, 2018).

I.11 La bactérie : *Pseudomonas aeruginosa*

I.11.1 Habitat

P. aeruginosa est une bactérie hydrotellurique ubiquitaire, parfois commensale du tube digestif de l'homme, saprophyte, répandue dans les zones humides : le sol, les lacs, les rivières, l'eau polluée, les piscines et les jacuzzis. Elle est largement répandue dans les poussières et les aliments crus (particulièrement les légumes : tomates, carottes, ...) (Benelmili, 2021).

I.11.2 Taxonomie et nomenclature

Etymologiquement, le mot issu du grec (pseudo =simili ou imitation) et (Monas=unité) désignait les germes du début de la microbiologie. Le mot aeruginosa, qui signifie vert de gris en latin, fait référence au pigment produit par la bactérie et qui donne à la colonie sa couleur caractéristique. *P. aeruginosa* est l'espèce type des Pseudomonas (Yétérian, 2010).

Pseudomonas aeruginosa appartient à :

- Règne: Bacteria
- Phylum: Proteobacteria
- Classe: Gamma proteobacteria
- Ordre : Pseudomonadales
- Famille : Pseudomonadaceae
- Genre : Pseudomonas
- Espèce : aeruginosa

Par définition, les bactéries du genre Pseudomonas sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à

métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques. (Mezaache, 2012).

I.11.3 Bactériologie de *Pseudomonas aeruginosa*

I.11.3.1 Caractères morphologiques

P. aeruginosa est une bactérie hétérotrophe, motile, Gram-négative en forme de bâtonnet d'environ 1–5 μm de long et 0,5–1,0 μm de large. (Chaker, 2012), C'est une bactérie à Gram négatif non fermentatif, parfois entouré d'une pseudo-capsule appelée slime qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie, il est très mobile grâce à une ciliature polaire en général monotriche. Il peut être cultivé facilement sur tous les milieux en aérobiose (température de 37°C ou 30 °C), il dégage une odeur aromatique caractéristique de seringa due à la production d'ortho amino-acétophénone (Solbi, 2013).

Généralement non capsulée mais parfois entourée d'une pseudo-capsule appelée slime qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie, elle est très mobile grâce à la présence de flagelle polaire généralement unique(monotriche) (figure.2) (Chaker, 2012).



Figure 3 : Bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Duarte, 2020)

I.11.3.2 Caractères cultureux

Le bacille pyocyanique est une bactérie aux besoins très limités. Croissant sur des milieux synthétiques simples, elle pousse facilement en 24 heures à 37°C. Elle peut croître

Les Bactéries

entre 4 et 40°C avec un optimum de 37°C. Par contre, elle supporte de moindres variations de pH (5,6 à 9,0) avec un pH optimal de 7.6. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie aérobie stricte c'est-à-dire quelle ne se développe qu'en Présence oxygène. Mais capable d'utiliser les nitrates en conditions anaérobies (**Batra, 2018**).

Il existe différents milieux de culture utilisés pour la culture de *Pseudomonas aeruginosa* en laboratoire et le plus souvent le milieu Nutrimet Agar et le milieu MacConkey Agar sont utilisés, les autres milieux sont les suivants :

- Milieu Columbia Horse Blood Agar.
- Milieu de gélose au sang de mouton.
- Milieu Tryptic Soy Agar.
- Milieu Cetrimide Agar (milieu sélectif).
- Le milieu liquide (milieu Nutrient Broth, milieu TSB, etc.).

Selon **Batra, (2018)** les types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée sur milieux solides (**Tableau 2**).

Tableau 2: Caractéristiques culturaux de *Pseudomonas aeruginosa*. (**Batra, 2018**)

Caractéristiques culturelles	Gélose nutritif	Milieu Cetrimide	Milieu MacConkey	Milieu de gélose au sang
Forme	Irrégulière	Circulaire	Circulaire	Circulaire à bords irrégulier
Taille	2-4 mm	1-3 mm	2-3 mm	2-4 mm
Élévation	Bas Convexe	Bas Convexe	Bas Convexe	Plat
Surface	Lisse (isolation fraîche) ; Mucoïde (Lorsque la couche visqueuse est formée)	Lisse (fraîche isolation) ; Mucoïde (lorsque la couche visqueuse se forme)	Lisse (fraîche isolation) ; Mucoïde (lorsque la couche visqueuse se forme)	Lisse (fraîche isolation) ; Mucoïde (lorsque la couche visqueuse se forme)
Couleur	Bleu verdâtre (dû à la production de pigment)	Bleu verdâtre (dû à la production de pigment)	Incolore	Blanc grisâtre
Structure	Translucide Opaque	Opaque	Transparent	Translucide Opaque

I.11.3.2.1 Caractères biochimiques et enzymatiques

P. aeruginosa est une bactérie possède : Indole -, urée -, TDA - (tryptophane désaminase), H₂S -, gélatine +, ONPG - (Orthonitrophényl-galactose), Nitrate réductase +, LDC -, (Lysine-décarboxylase), ODC- (Ornithine-décarboxylase), ADH+ (Arginine déshydrogénase) (**Liaziid, 2012**). Production de pigments de *Pseudomonas aeruginosa* produit deux types de pigments (fluorescent ou non) qui servent à son identification. Ils peuvent être mis en évidence dans le milieu de King B et King A. Pyoverdine ; pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le Chloroforme. Pyocyanine (phénazinique) ; pigment bleu-vert non fluorescent soluble dans l'eau et le chloroforme. Cette espèce est la seule à le produire (**Delarras, 2007**)

I.11.3.2.2 Caractères antigéniques

L'aspect irisé des colonies et le pigment vert orienteront très vite le diagnostic.

La confirmation pourra être apportée de façon minimum par :

- le caractère mobile et gram- des bacilles
- le caractère aérobie strict
- une oxydase positive violente (sauf pour les colonies muqueuses)
- la pousse à 41°C
- la résistance à la kanamycine.

Pour les souches atypiques quant à leurs caractères cultureux, la réalisation d'une identification biochimique pourra être lancée à l'aide de galeries : les caractères principaux sont la production d'une arginine dihydrolase, gélatinase, nitrate réductase et l'assimilation de certains hydrates de carbone comme le glucose. (**Clave, 2011**).

I.11.3.2.3 Caractères génomiques

Le génome de la souche PA01 de *P. aeruginosa* a été complètement séquencé en 2000. Il comprend 6,3 millions de paires de bases contenant 5570 gènes avec un pourcentage molaire C+G important (66%). Seuls 6,7 % de ces gènes ont une fonction bien connue. Le pourcentage des séquences régulatrices est plus important dans le génome entier de *P. aeruginosa* (8,4%) (**Stover et al., 2000**)

CHAPITRE II

ADN et Mutagenèse

II.1 ADN

II.1.1 Définition de l'ADN

L'ADN, ou acide désoxyribonucléique, est une molécule biologique qui contient l'information génétique des organismes vivants. Il est présent dans les cellules de tous les êtres vivants et est responsable de la transmission des caractéristiques héréditaires d'une génération à l'autre.

La structure de l'ADN est en forme de double hélice, constituée de deux brins complémentaires de nucléotides reliés par des liaisons hydrogène entre les bases azotées. Les quatre bases azotées qui composent l'ADN sont l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). Cette structure en double hélice permet à l'ADN de se répliquer de manière fidèle, en conservant l'information génétique lors de la division cellulaire. **(Watson et Crick, 1953)**

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

Les biopolymères et les macromolécules connus sous le nom d'acides nucléiques sont essentiels à la vie de tous les êtres connus. Les nucléotides, qui sont les monomères constitutifs des acides nucléiques, sont composés d'un sucre à cinq carbones, d'un groupe phosphate et d'une base azotée. Ces éléments forment les blocs de construction des nucléotides. L'ADN, acronyme d'acide désoxyribonucléique, et l'ARN, acronyme d'acide ribonucléique, sont les deux principaux types d'acides nucléiques. Lorsque le sucre est le ribose, l'ARN est le polymère prédominant, tandis que l'ADN est le polymère lorsque le sucre est le désoxyribose, une dérivation du ribose.

Les acides nucléiques sont des composés chimiques présents naturellement, jouant un rôle crucial en tant que molécules principales porteuses d'informations au sein des cellules. Ils sont également responsables de la constitution du matériel génétique. Présents abondamment dans tous les organismes vivants, les acides nucléiques sont responsables de la création, de l'encodage et du stockage de l'information dans chaque cellule vivante, quelle que soit la forme de vie présente sur Terre. Ils assurent la transmission et l'expression de cette

information à l'intérieur et à l'extérieur du noyau cellulaire, régulant ainsi les processus internes de la cellule et contribuant ultimement à la formation de chaque être vivant.

La séquence d'acide nucléique, qui fournit l'ordre « échelle étape » des nucléotides à l'intérieur des molécules d'ARN et d'ADN, est le milieu à travers lequel l'information qui a été codée est à la fois stockée et transmise. Ils jouent un rôle particulièrement crucial dans la détermination du déroulement du processus de synthèse des protéines. **(Fouad, 2022)**

II.1.3 Le rôle d'ADN

L'ADN joue également un rôle crucial dans la réponse de l'organisme aux changements environnementaux et aux mutations génétiques. Les mutations peuvent être bénéfiques, neutres ou préjudiciables pour la survie de l'organisme. L'ADN permet aux organismes de s'adapter à leur environnement en produisant de nouvelles variantes génétiques qui peuvent être sélectionnées pour leur utilité. Cela permet aux organismes de s'adapter et d'évoluer au fil du temps.

De plus, l'ADN régule l'expression génique, c'est-à-dire qu'il contrôle la façon dont les gènes sont transcrits et traduits en protéines. Cette régulation peut être influencée par des facteurs internes et externes, tels que l'environnement, l'âge et les maladies. Des mutations ou des anomalies dans l'ADN peuvent entraîner des changements dans l'expression génique, ce qui peut avoir des conséquences sur la santé de l'organisme.

Enfin, l'ADN est également impliqué dans la transmission de l'information génétique d'une génération à l'autre. Lors de la reproduction sexuée, les gamètes (ovules et spermatozoïdes) contiennent une moitié de l'information génétique de chaque parent. Lorsque les gamètes se fusionnent, l'ADN des deux parents se combine pour former un nouvel organisme avec une combinaison unique d'informations génétiques. **(Alberts *et al.*, 2002)**

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

L'ADN est également important dans la compréhension des mutations génétiques, qui peuvent causer des maladies et des troubles génétiques. Les mutations sont des changements dans la séquence d'ADN qui peuvent se produire spontanément ou être causés par des facteurs externes, tels que les rayonnements ionisants, les produits chimiques ou les virus.

La compréhension des mutations génétiques est importante pour la recherche sur les maladies génétiques, ainsi que pour le développement de traitements ciblés et de thérapies géniques. En identifiant les mutations responsables d'une maladie, les scientifiques peuvent

travailler à développer des traitements pour inverser les effets de la mutation ou pour corriger la mutation elle-même. L'ADN est également important pour la recherche en biologie évolutive, car il peut être utilisé pour reconstituer l'histoire évolutive des espèces. En comparant les séquences d'ADN de différentes espèces, les scientifiques peuvent déterminer les relations de parenté et les schémas d'évolution des espèces.

Enfin, l'ADN a également des implications éthiques et sociales, notamment en matière de protection de la vie privée et de la discrimination génétique. La compréhension de l'ADN et de son utilisation dans différents domaines nécessite une réflexion approfondie sur les implications éthiques et sociales de ces avancées.

En résumé, l'ADN est une molécule fondamentale pour la vie et la compréhension de la génétique. Il joue un rôle important dans la recherche sur les maladies génétiques, la biologie évolutive, ainsi que dans les implications éthiques et sociales de son utilisation. (**Collins *et al.*, 2003**).

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

En 1953, James Watson et Francis Crick ont découvert la structure en double hélice de l'ADN, une découverte qui a révolutionné la biologie moléculaire et a permis de comprendre comment l'information génétique est stockée et transmise.

Leur travail a été publié dans la revue *Nature* en avril 1953 sous le titre "Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribose nucleic acid". Dans cet article, Watson et Crick ont présenté un modèle en trois dimensions de la structure de l'ADN, basé sur des données expérimentales de diffraction des rayons X.

La structure en double hélice de l'ADN se compose de deux brins de nucléotides enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice. Les brins sont maintenus ensemble par des liaisons hydrogène entre les bases azotées complémentaires (adénine-thymine et cytosine-guanine), ce qui permet à l'ADN de se répliquer fidèlement lors de la division cellulaire.

La découverte de la structure en double hélice de l'ADN a ouvert la voie à de nombreuses avancées dans la compréhension de la biologie moléculaire, de la génétique et de la médecine, et a conduit à de nombreuses applications pratiques dans des domaines tels que

la médecine légale, la biotechnologie et la recherche sur les maladies génétiques. (**Watson et Crick, 1953**)

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

De Watson et Crick

La prise de conscience de Chargaff que $A = T$ et $C = G$, combinée à des travaux de cristallographie aux rayons X d'une importance cruciale par les chercheurs anglais Rosalind Franklin et Maurice Wilkins, a contribué à la dérivation par Watson et Crick du modèle tridimensionnel à double hélice pour la structure de l'ADN. La découverte de Watson et Crick a également été rendue possible par les progrès récents dans la construction de modèles, ou l'assemblage de structures tridimensionnelles possibles basées sur des distances moléculaires et des angles de liaison connus, une technique avancée par le biochimiste américain Linus Pauling. En fait, Watson et Crick craignaient d'être « récupérés » par Pauling, qui a proposé un modèle différent pour la structure tridimensionnelle de l'ADN quelques mois avant eux. En fin de compte, cependant, la prédiction de Pauling était incorrecte. (**Pray, 2008**)

À l'aide de découpes en carton représentant les composants chimiques individuels des quatre bases et d'autres sous-unités nucléotidiques, Watson et Crick ont déplacé les molécules sur leur bureau, comme s'ils assemblaient un puzzle. Ils ont été induits en erreur pendant un certain temps par une compréhension erronée de la configuration des différents éléments de la thymine et de la guanine (en particulier, les anneaux de carbone, d'azote, d'hydrogène et d'oxygène). Ce n'est que sur la suggestion du scientifique américain Jerry Donohue que Watson a décidé de faire de nouvelles découpes en carton des deux bases, pour voir si peut-être une configuration atomique différente ferait une différence. Ça faisait. Non seulement les bases complémentaires s'emboîtaient parfaitement (c'est-à-dire A avec T et C avec G), chaque paire étant maintenue ensemble par des liaisons hydrogène, mais la structure reflétait également la règle de Chargaff (**Figure 4**). (**Pray, 2008**)

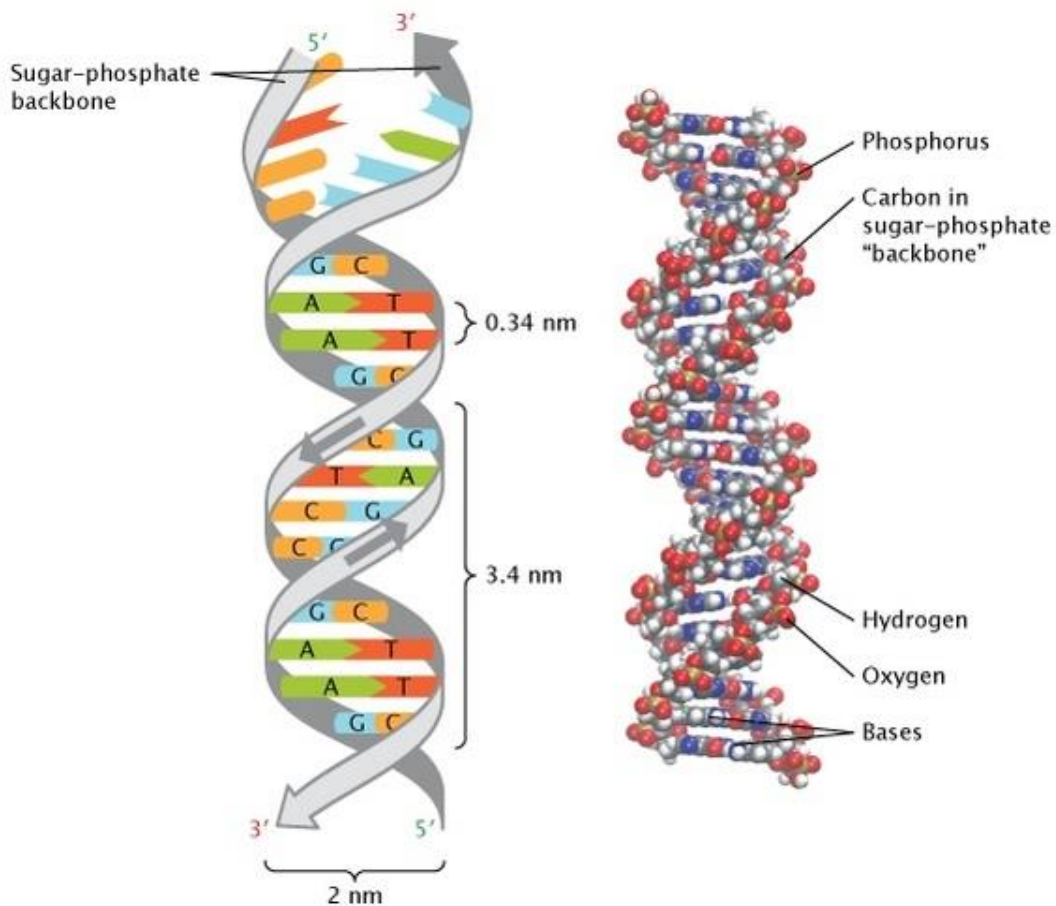


Figure 4 : La structure en double hélice de l'ADN (Pray, 2008).

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

Alors que le nom de Johann Miescher s'est estompé au XXe siècle, d'autres scientifiques ont persisté à démêler la composition chimique de la molécule précédemment connue sous le nom de nucléine. Cependant, les scientifiques ont finalement reconnu la simplification excessive de la structure tétra nucléotidique de Levene, car l'ordre des nucléotides le long d'un brin d'ADN (ou d'ARN) s'est avéré très variable. Malgré cette prise de conscience, la structure polynucléotidique de Levene est restée exacte à plusieurs égards. Aujourd'hui, nous comprenons que l'ADN est composé d'une séquence de nucléotides, chacun composé de trois composants : un groupe phosphate, une molécule de sucre (ribose dans l'ARN et désoxyribose dans l'ADN) et une seule base contenant de l'azote. De plus, les bases azotées sont classées en deux groupes : les purines (adénine [A] et guanine [G]), chacune avec deux cycles fusionnés, et les pyrimidines (cytosine [C], thymine [T] et uracile [U]), chacune avec un seul anneau. Il est largement admis que l'ARN ne contient que A, G,

C et U (pas de T), tandis que l'ADN ne contient que A, G, C et T (pas de U). (Pray, 2008 ; Furelaud, 2003)

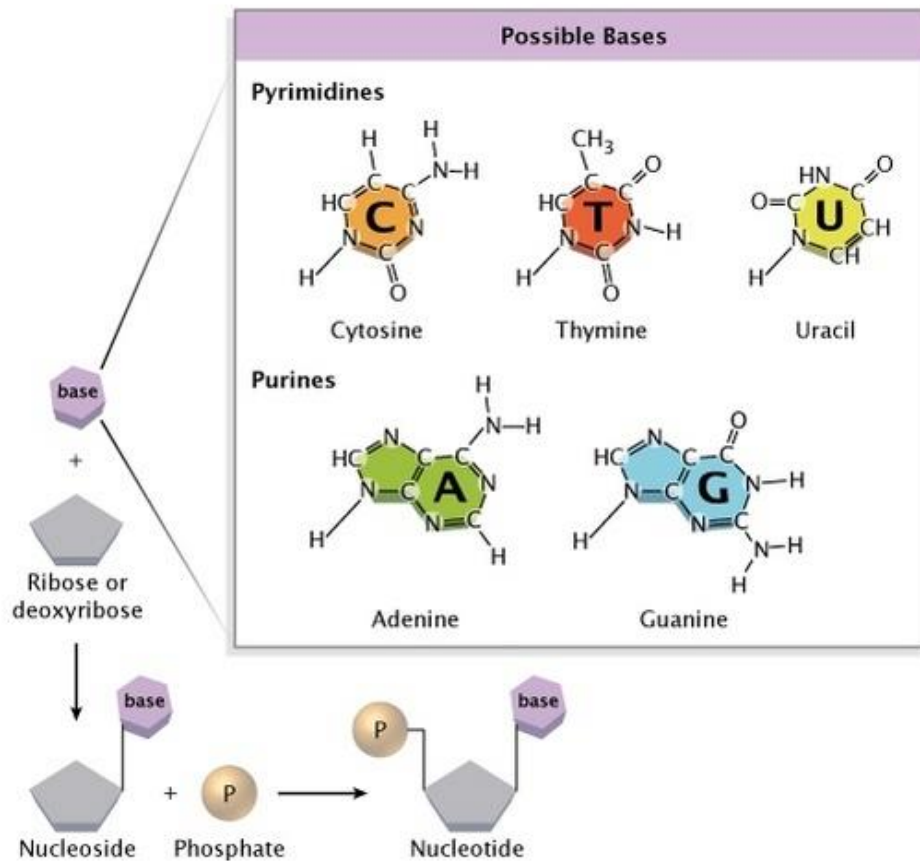


Figure 5 : La structure chimique d'un nucléotide. (Pray, 2008)

Un seul nucléotide est composé de trois composants : une base contenant de l'azote, un sucre à cinq carbones et un groupe phosphate. La base azotée est soit une purine, soit une pyrimidine. Le sucre à cinq carbones est soit une molécule de ribose (dans l'ARN) soit une molécule de désoxyribose (dans l'ADN). (Pray, 2008)

II.1.6 Organisation de l'ADN dans les chromosomes

L'ADN est organisé en structures appelées chromosomes. Les chromosomes sont constitués de longues molécules d'ADN qui sont enroulées autour de protéines appelées histones. Cette organisation compacte permet de stocker une grande quantité d'ADN dans un espace restreint. Les chromosomes sont présents dans le noyau de chaque cellule eucaryote. Les humains ont 23 paires de chromosomes, pour un total de 46 chromosomes. Les chromosomes contiennent des gènes, qui sont des segments d'ADN qui codent pour des

protéines spécifiques. Les gènes sont organisés en séquences linéaires le long des chromosomes.

Les chromosomes jouent un rôle important dans la reproduction cellulaire. Avant qu'une cellule se divise en deux cellules filles, elle duplique ses chromosomes pour que chaque cellule fille reçoive une copie complète de l'ADN. Les chromosomes jouent également un rôle dans la variation génétique en permettant des échanges d'informations génétiques entre les chromosomes homologues lors de la méiose, le processus de formation des cellules reproductrices. (Griffiths *et al.*, 2000)

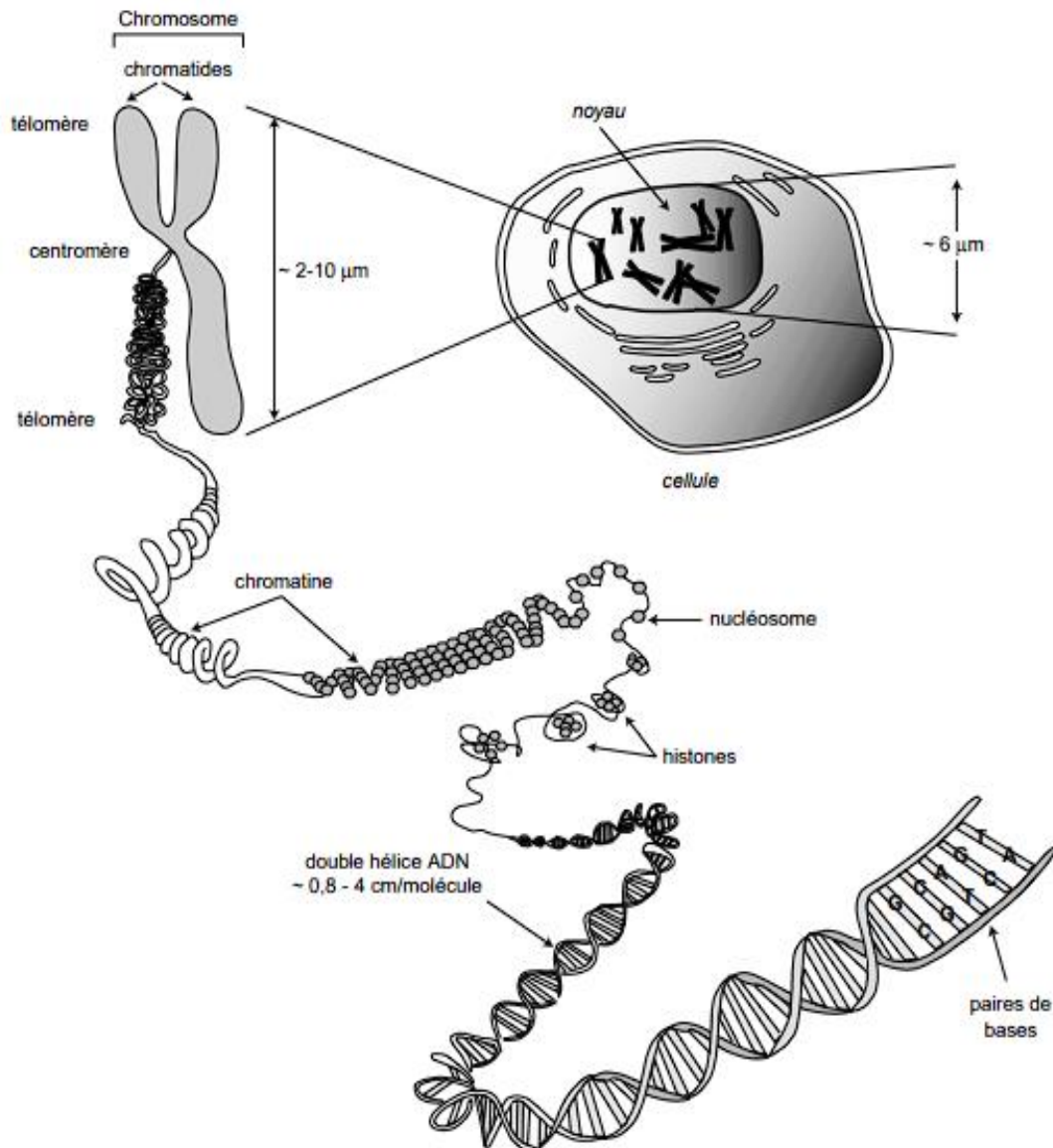


Figure 6: Structure d'un chromosome. (Hayes, 2000)

II.1.7 Structure et diversité des chromosomes chez les bactéries

Contrairement aux cellules eucaryotes qui possèdent des chromosomes linéaires, la plupart des bactéries ont un seul chromosome circulaire fermé de manière covalente. Cependant, toutes les bactéries n'ont pas un seul chromosome circulaire ; certaines bactéries possèdent plusieurs chromosomes circulaires, tandis que d'autres ont à la fois des chromosomes linéaires et des plasmides linéaires. Plusieurs chromosomes ont également été observés dans diverses bactéries, notamment *Brucella*, *Leptospira interrogans*, *Burkholderia* et *Vibrio cholerae*. Certaines bactéries, telles que *Borrelia* et *Streptomyces*, ont des chromosomes linéaires, et de nombreuses souches de ces bactéries contiennent à la fois des plasmides linéaires et circulaires. La longueur du chromosome d'*E. coli* est d'environ 1,35 mm, soit plusieurs centaines de fois plus longue que la taille de la cellule bactérienne. Pour accueillir ce grand chromosome dans l'espace confiné de la cellule, l'ADN circulaire est bouclé et super enroulé. (Rao, 2006)

II.1.8 Réplication de l'ADN

II.1.8.1 Processus de la réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est le processus par lequel une cellule copie son ADN afin de produire une copie identique qui sera transmise à chaque cellule fille lors de la division cellulaire. Ce processus comporte plusieurs étapes clés :

- 1) L'ouverture de la double hélice d'ADN : l'enzyme hélicase sépare les deux brins d'ADN en cassant les liaisons hydrogène qui les maintiennent ensemble.
- 2) L'amorçage : une amorce est ajoutée à chaque brin d'ADN par une enzyme appelée primase. Cette amorce fournit un point de départ pour la synthèse de la nouvelle chaîne d'ADN.
- 3) L'élongation : les enzymes appelées ADN polymérases synthétisent les nouveaux brins d'ADN en utilisant chaque brin d'ADN parental comme modèle. Les nucléotides libres s'apparient avec les bases complémentaires sur le brin parental, formant ainsi une nouvelle chaîne d'ADN complémentaire.
- 4) La correction des erreurs : une fois que la réplication est terminée, des enzymes de correction d'erreurs vérifient le nouvel ADN pour s'assurer qu'il ne contient pas d'erreurs de séquence. (Alberts *et al.*, 2002).

II.1.9 Rôle des enzymes dans la réplication

La réplication de l'ADN est un processus complexe qui implique plusieurs enzymes. L'ADN polymérase est l'enzyme principale impliquée dans la réplication de l'ADN. Cette enzyme est responsable de la synthèse de nouveaux brins d'ADN en utilisant les brins parentaux comme matrice. L'ADN polymérase ajoute des nucléotides à l'extrémité 3' du brin en croissance, en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de nucléosides triphosphates.

L'hélicase est une autre enzyme importante dans la réplication de l'ADN. Elle est responsable de la séparation des brins parentaux en déroulant la double hélice. L'ADN gyrase est une enzyme qui élimine les tensions créées par l'hélice lors du déroulement de la double hélice. **(Burgers et Kunkel, 2017)**

D'autres enzymes, telles que les primases, les exonucléases et les ligases d'ADN, jouent également un rôle important dans la réplication de l'ADN. Les primases sont responsables de la synthèse des amorces d'ARN nécessaires à la synthèse des nouveaux brins d'ADN. Les exonucléases éliminent les nucléotides mal appariés de l'extrémité 3' du brin en croissance. Les ligases d'ADN sont responsables de la liaison des fragments d'ADN Okazaki pour former un brin continu. Ensemble, ces enzymes travaillent en tandem pour permettre la réplication de l'ADN avec une grande précision et une efficacité élevée. **(Stillman, 2008)**

II.2 Mutations de l'ADN

II.2.1 Définition de mutation

Les mutations sont des altérations héréditaires du matériel génétique qui peuvent se produire spontanément ou être provoquées par des substances chimiques ou des facteurs physiques. Les organismes considérés comme des références non mutés sont appelés "sauvages", tandis que leur descendance présentant des mutations est appelée "mutants". Le processus de mutation est connu sous le nom de mutagenèse, et les substances responsables de l'induction des mutations sont appelées "mutagènes". La plupart des mutations spontanées se produisent lors de la réplication de l'ADN. La position de la mutation sur les gènes est importante. **((Rao, 2006 ; Nicklin *et al.*, 2000).**

II.2.2 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est une mutation qui vise un gène connu qu'on veut étudier. Souvent, avec les bactéries, le mode de mutation utilisé est la conjugaison. Cette dernière est basée sur la recombinaison homologue dirigée dans le génome bactérien par reconnaissance

de séquences. Ce processus naturel est sexuel et nécessite un contact préalable entre bactéries de sexe différent : une bactérie « mâle », la bactérie donatrice et une bactérie « femelle », réceptrice. Le mâle possède le plasmide F (facteur de sexualité ou de fertilité) qui lui permet de synthétiser des pili sexuels et de donner la polarité au chromosome. Par la suite, l'ADN simple brin s'intègre à l'endroit précis où se retrouve la séquence homologue correspondant au gène à muter. Le transfert d'ADN chromosomique est à sens unique, orienté, progressif et quelquefois total. Expérimentalement, ce processus peut être possible à l'aide d'un plasmide et de souches possédant le gène F conférant la capacité de transférer du matériel génétique à l'aide d'un pili. (De carufel, 2008)

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

II.2.3.1 Mutation faux-sens

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

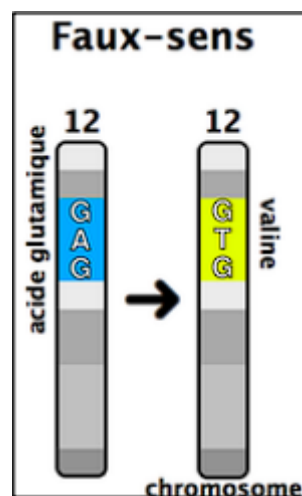


Figure 7 : schéma de mutation faux sens (Chellat, 2020-2021)

II.2.3.2 Mutation non-sens

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

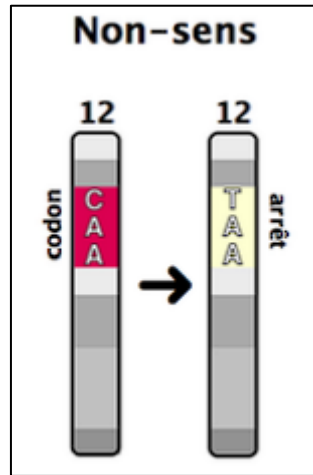


Figure 8 : schéma de mutation non-sens (Chellat, 2020-2021)

II.2.3.3 Mutation silencieuse

Toutes les mutations ne pouvaient pas produire des changements visibles dans le phénotype et le génotype d'un organisme ; ces mutations sont appelées mutations silencieuses, dans lequel une mutation d'une seule paire de bases ne modifie pas le produit d'acide aminé (Graur, 2003)

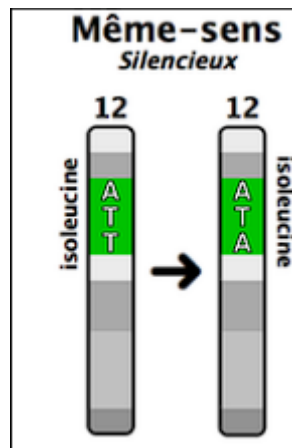


Figure 9 : schéma mutation silencieuse (Chellat, 2020-2021)

II.2.3.4 Mutation de décalage de cadre

Les mutations de décalage de cadre impliquent l'ajout ou la suppression de paires de bases provoquant un changement dans le "cadre de lecture" du gène. Cela provoque un décalage du cadre de lecture et tous les codons et tous les acides aminés après cette mutation sont généralement erronés. Étant donné que l'ajout d'acides aminés à la chaîne protéique est déterminé par les trois codons de base, lorsque la séquence globale du gène est modifiée, la séquence d'acides aminés peut également être modifiée. (Rao, 2006)

II.2.3.5 Mutation de duplication

Souvent, lors de dommages à l'ADN, les télomères sont perdus, ce qui rend les extrémités de l'ADN collantes, qui fusionnent, et pendant l'anaphase lors de la migration vers les pôles respectifs, il se produit une rupture inégale du chromosome générant des fragments acentriques et dicentriques. Le fragment acentrique est perdu, tandis que le fragment dicentrique est tiré vers les extrémités opposées, entraînant la rupture du fragment. Cela donne un produit déséquilibré car la rupture ne se produit pas nécessairement au centre du chromosome et crée des duplications dans un brin appelées mutations de duplication et des délétions dans l'autre. (Murnane, 2012)

II.2.3.6 Mutation suppressive

C'est une inversion d'un phénotype mutant par une autre mutation à une position sur l'ADN distincte de celle de la mutation originelle. La vraie réversion ou la rétro mutation entraîne la réversion d'un mutant à l'original forme, qui se produit à la suite d'une mutation se produisant à nouveau au même endroit. (Rao, 2006)

II.2.3.7 Mutation létale conditionnelle

Parfois, une mutation peut affecter un organisme de telle manière que le mutant peut ne survivre que dans certaines conditions environnementales. (Rao, 2006)

II.2.3.8 Mutation d'inversion

Si un segment d'ADN est retiré et réinséré dans le sens inverse, cela s'appelle une inversion mutation. Sur la base de l'étendue des changements de paires de bases, les mutations peuvent être de deux types ; microlésion et macro lésion. Les microlésions sont essentiellement des mutations ponctuelles (affectant des paires de bases uniques) tandis que les macro lésions impliquent l'addition, la suppression, l'inversion ou la duplication de plusieurs paires de bases. Les mutations de l'ADN peuvent se produire spontanément ou peuvent être causées par une force ou une substance externe appelée mutagène. Les mutagènes peuvent être des produits chimiques tels que l'acide nitreux, qui modifie l'adénine pour qu'elle s'associe à la cytosine au lieu de la thymine. D'autres mutagènes chimiques comprennent les colorants d'acridine, les analogues de nucléosides dont la structure est similaire à celle des bases azotées, le benzopyrène (provenant de la fumée et de la suie) et l'aflatoxine. Les radiations peuvent également être une cause de mutations de l'ADN. Il a été démontré que les ondes lumineuses à haute énergie telles que les rayons X, les rayons gamma et la lumière ultraviolette endommagent l'ADN. La lumière UV est responsable de la

formation de dimères de thymine dans lesquels des liaisons covalentes sont établies entre les molécules de thymine. Ces liens modifient la forme physique de l'ADN, empêchant la transcription et la réplication. (Rao, 2006)

II.2.4 Les agents mutagènes

Les agents mutagènes sont des substances ou des agents présents dans l'environnement qui ont la capacité de provoquer des altérations dans la séquence d'ADN. Ils peuvent agir de différentes manières, notamment en remplaçant, en modifiant ou en endommageant certaines parties de l'ADN. En conséquence, les agents mutagènes peuvent augmenter la fréquence d'apparition de ces mutations. Les agents mutagènes peuvent être classés en trois catégories principales : Les mutagènes physiques comprennent divers types de rayonnements ionisants et non ionisants tels que les rayons ultraviolets (UV), les rayons infrarouges (IR), les rayons X, les rayons gamma, les particules alpha, les particules bêta ou les neutrons à déplacement rapide.; les agents chimiques, tels que les analogues de bases, l'acide nitreux, les agents intercalants et les agents alkylants ; et enfin, les agents biologiques, tels que les transposons, qui sont des éléments génétiques mobiles capables de se déplacer et d'insérer dans l'ADN. (Kodym et Afza, 2003 ; Dixit et Kumar, 2018) (Tableau 3)

Tableau 3 : Les agents mutagènes selon leur catégorie (Allet *et al.*, 2013)

Les agents physiques	Les agents chimiques	Les agents biologiques
Rayonnement non ionisant (UV)	Les analogues de bases	Les transposons
Rayonnement ionisant (rayons X)	L'acide nitreux	
	Agents intercalants	
	Agents alkylants	

II.2.4.1 Les agents physiques

II.2.4.1.1 Rayonnement non ionisant (UV)

<< Ultraviolets >> est le nom donné aux rayonnements électromagnétiques s'étendant dans la gamme des longueurs d'ondes situées d'une part immédiatement en deçà du violet, en extrémité du spectre visible (400nm) et d'autre part avant les rayons X (100nm).

Le spectre des rayonnements UV est donc par définition compris entre 100 et 400nm et est invisible (Rosset et Rosset, 1996). La lumière UV est non-ionisante, non- chimique et athermique ce qui reste une technique respectueuse pour l'environnement, facile à appliquer et économique (Demirci et Ngadi, 2012).

D'après Olhsson et Bergtsson. (2010), les rayonnements UV présentent des effets différents selon leur longueur d'onde. Aussi, le spectre UV est-il arbitrairement en 3 bandes comme suit (Figures 10 et 11) :

UV-A, ondes longues entre 315-400nm, à effet bronzant.

UV-B, ondes moyennes entre 280-315nm à effet érythémateux.

UV-C, ondes courtes entre 100-280nm à propriétés germicides et photochimiques.

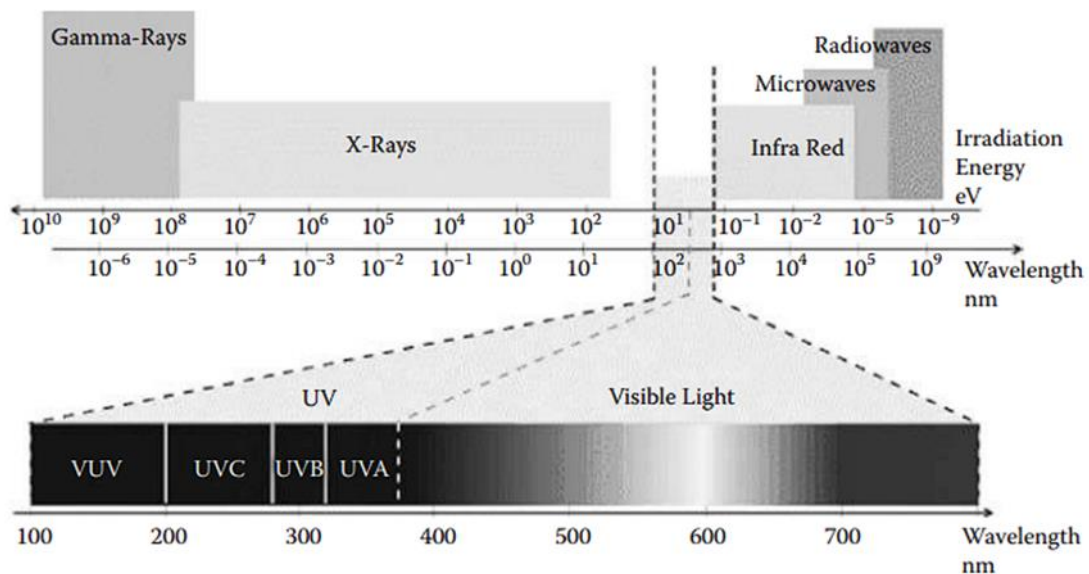


Figure 10: Electromagnetic radiation spectrum with a division of light spectrum on visible and UV light in the three different types. (Koutchma *et al.*, 2009)

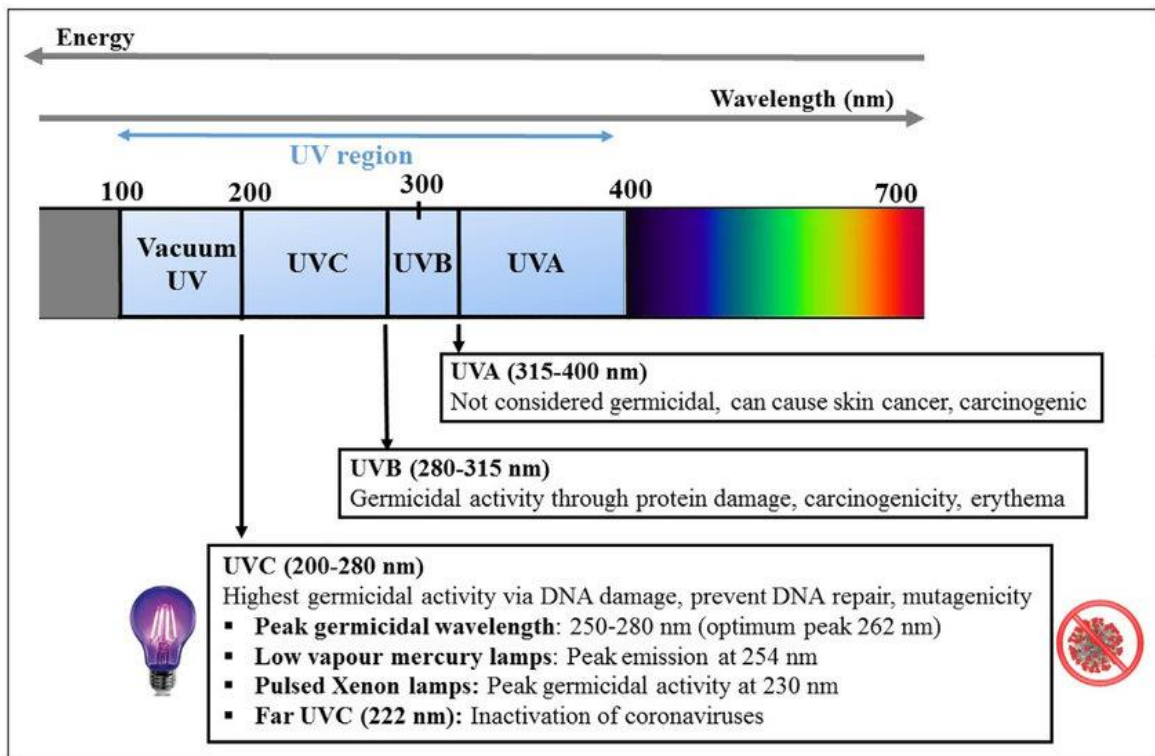


Figure 11 : Le spectre ultraviolet (UV) (100-400 nm), les gammes de longueurs d'onde correspondantes, leur activité germicide et les risques pour la santé humaine. (Bhardwaj *et al.*, 2021).

II.2.4.1.2 Rayonnement ionisant (rayons X)

Le rayonnement ionisant, notamment les rayons X, est une forme de rayonnement électromagnétique qui possède suffisamment d'énergie pour éjecter les électrons des atomes et ainsi ioniser la matière avec laquelle il interagit. Le rayonnement ionisant, y compris les rayons X, peut avoir des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement. Lorsqu'une personne est exposée à des niveaux élevés de rayonnement ionisant, cela peut entraîner des dommages à l'ADN et d'autres composants cellulaires, augmentant ainsi le risque de développement de cancers et d'autres maladies liées à l'irradiation. (Bhattacharya *et al.*, 2021).

II.2.4.2 Les agents chimiques

II.2.4.2.1 Les analogues de bases

Les analogues de bases sont des composés chimiques qui ressemblent structurellement aux bases nucléiques (adénine, cytosine, guanine et thymine) présentes dans l'ADN et l'ARN. Ces analogues peuvent être utilisés à des fins de recherche pour étudier les processus biologiques impliquant l'ADN et l'ARN, ainsi que pour concevoir des médicaments antiviraux ou anticancéreux.

L'utilisation d'analogues de bases permet de manipuler sélectivement la séquence d'ADN ou d'ARN, en remplaçant une base spécifique par un analogue. Cela peut avoir des effets différents sur la structure et la fonction de l'ADN ou de l'ARN, ce qui permet d'étudier les rôles spécifiques des bases nucléiques ou de modifier les propriétés de l'ADN ou de l'ARN à des fins thérapeutiques. Par exemple, certains analogues de bases peuvent inhiber la réplication virale en interférant avec la synthèse de l'ADN viral. D'autres analogues de bases peuvent être utilisés en chimiothérapie pour cibler et perturber la réplication de l'ADN dans les cellules cancéreuses, inhibant ainsi leur croissance. (Maugeri *et al.*, 2019).

II.2.4.2.2 L'acide nitreux

L'acide nitreux est un composé chimique de formule chimique HNO_2 . Il se présente sous la forme d'un liquide instable et incolore à basse température, mais il peut se décomposer rapidement à des températures élevées. L'acide nitreux est principalement utilisé comme agent nitrosant, ce qui signifie qu'il est capable de réagir avec certains composés organiques pour former des nitrosamines, qui sont des substances potentiellement cancérigènes. Il est également utilisé dans diverses réactions chimiques, telles que la préparation de sels nitrite et d'oxydants. (Bhardwaj *et al.*, 2021)

II.2.4.2.3 Les agents intercalants

Les agents intercalants sont des substances chimiques qui ont la capacité de s'insérer entre les paires de bases de l'ADN à double brin. En intercalant entre les bases, ces agents perturbent la structure de l'ADN, entraînant des déformations de l'hélice et une distorsion de la séquence génétique. Cette perturbation de l'ADN peut interférer avec la réplication et la transcription de l'ADN, entraînant des erreurs dans la synthèse des protéines et pouvant conduire à des mutations génétiques.

Les agents intercalants peuvent être utilisés en laboratoire à des fins de recherche, notamment pour l'analyse de l'ADN, la coloration des acides nucléiques ou la détection de mutations spécifiques. Certains agents intercalants, tels que l'éthidium bromide, sont couramment utilisés en biologie moléculaire pour la visualisation de l'ADN lors de l'électrophorèse sur gel. (Nagel et Klinman, 2017)

II.2.4.2.4 Les agents alkylants

Les agents alkylants sont des substances chimiques qui peuvent former des liaisons covalentes avec l'ADN, les protéines et d'autres molécules biologiques en ajoutant des groupes alkyle (comme le méthyle, l'éthyle, le propyle, etc.) à ces composés. Cette alkylation

provoque des modifications structurelles dans les macromolécules biologiques, ce qui peut entraîner des dommages et des altérations dans leur fonctionnement normal.

La caractérisation des agents alkylants comprend leur capacité à former des liaisons covalentes avec des groupes fonctionnels spécifiques dans les molécules biologiques, ainsi que leur efficacité et leur sélectivité dans le traitement du cancer. Leur potentiel mutagène et leur capacité à induire des mutations génétiques sont également des aspects importants à considérer dans leur caractérisation. **(Bhardwaj *et al.*, 2021)**

II.2.4.3 Les agents biologiques

II.2.4.3.1 Les transposons

Les transposons, également connus sous le nom d'éléments transposables ou de séquences d'ADN mobiles, sont des éléments génétiques présents dans les génomes des organismes vivants. Ils sont capables de se déplacer ou de se dupliquer et de s'insérer dans différentes régions de l'ADN. Les transposons peuvent entraîner des mutations génétiques en s'insérant dans des gènes fonctionnels ou en provoquant des réarrangements génomiques. Ces éléments génétiques mobiles sont présents dans de nombreux organismes, y compris les bactéries, les plantes et les animaux, y compris les humains. Ils peuvent être classés en plusieurs types selon leur mécanisme de mouvement, notamment les transposons à ADN, les rétrotransposons à ARN et les rétrotransposons à ADN intermédiaire. **(Nakamura, 2019)**

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

La réparation de l'ADN est mise en œuvre via une grande variété de mécanismes adaptés à chaque type de lésion : réparation directe, réparation des mésappariements causés par le processus de réplication, réparation par excision et échange de base, réparation par excision et échange de nucléotides, réparation des cassures double brin par recombinaison homologue ou non homologue. Chacun de ces mécanismes met en jeu de nombreuses protéines au sein de complexes fonctionnels supramoléculaires. Certains agents anticancéreux provoquent des lésions de l'ADN qui peuvent déborder les mécanismes de réparation. L'impossibilité de réparer des lésions de l'ADN conduit normalement à la mort cellulaire, mais des altérations des mécanismes de réparation peuvent favoriser l'instabilité génétique et participer ainsi à l'oncogenèse. **(Pourquier et Robert, 2011).**

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

Est la principale Voie de réparation de l'ADN qui corrige les lésions basiques qui surviennent en raison de l'oxydation, de l'alkylation, de la désamination et de dommages de dépurination/dépyrimidination. Le BER facilite la réparation de l'ADN endommagé via deux voies - patch court et patch long. La voie courte du BER conduit à une voie de réparation d'un seul nucléotide. Alternativement, la voie BER à long patch produit une voie de réparation d'au moins deux nucléotides. La voie BER est initiée par l'un des nombreux ADN glycosylases, qui reconnaissent et catalysent l'élimination des bases endommagées. (Robertson *et al.*, 2009). Une ADN polymérase remplit à nouveau l'espace libéré en utilisant la base complémentaire comme matrice. Enfin, une ADN ligase suture le brin réparé. (Zhang, 2014)

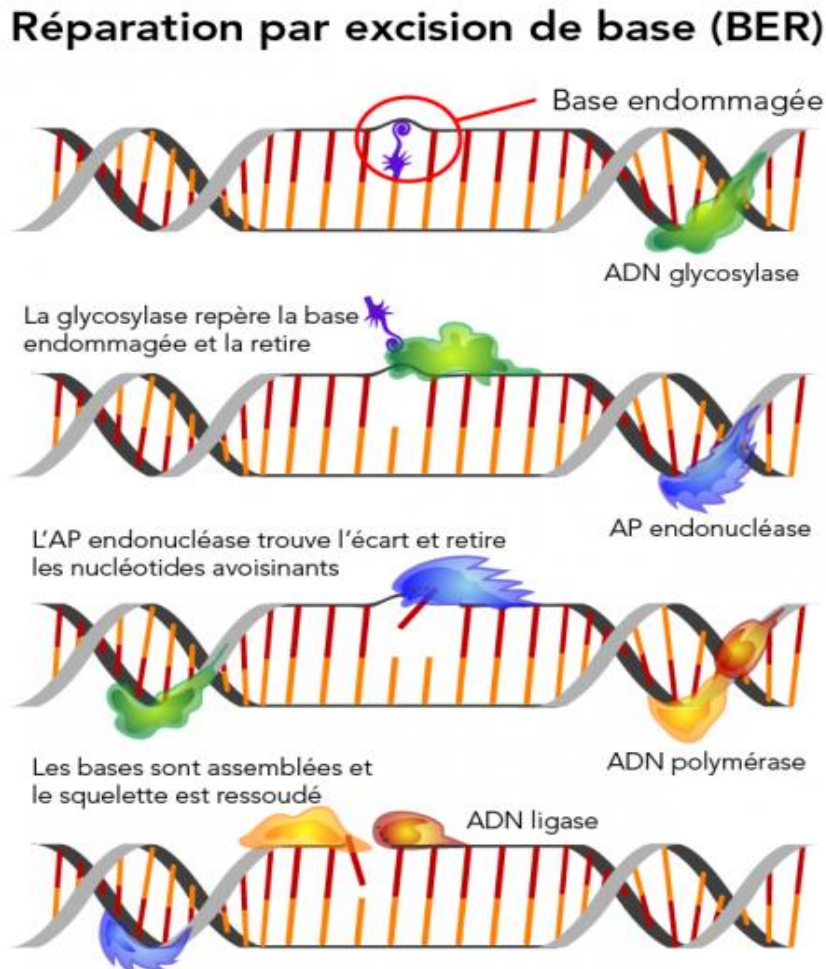


Figure 12 : La réparation par excision de bases est l'une des formes les plus simple de réparation de l'ADN. (LadyofHats. 2008)

II.2.5.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision du nucléotide (NER) est un mécanisme plus flexible que le BER. Elle permet la réparation par excision d'un segment d'ADN contenant le site endommagé. Le principe est la reconnaissance de la perturbation engendrée par le dommage quelle que soit sa nature puis une endonucléase clive de part et d'autre de la lésion. Le segment d'ADN contenant la lésion est éliminé grâce à une activité hélicase. L'ADN polymérase synthétise un nouveau brin à partir de l'extrémité 3'OH libre puis l'ADN ligase lie le segment nouvellement synthétisé au brin d'ADN (**figure 13**). Chez *E. coli*, le NER est catalysé par l'excinuéclase UvrABC et une hélicase UvrD. L'inactivation d'UvrD augmente la fréquence de mutations spontanées par un facteur 100. (**Washburn et Kushner, 1991 ; Hall, 1995 ; LeCuyer *et al.*, 2010 ; Zhang, 2014**).

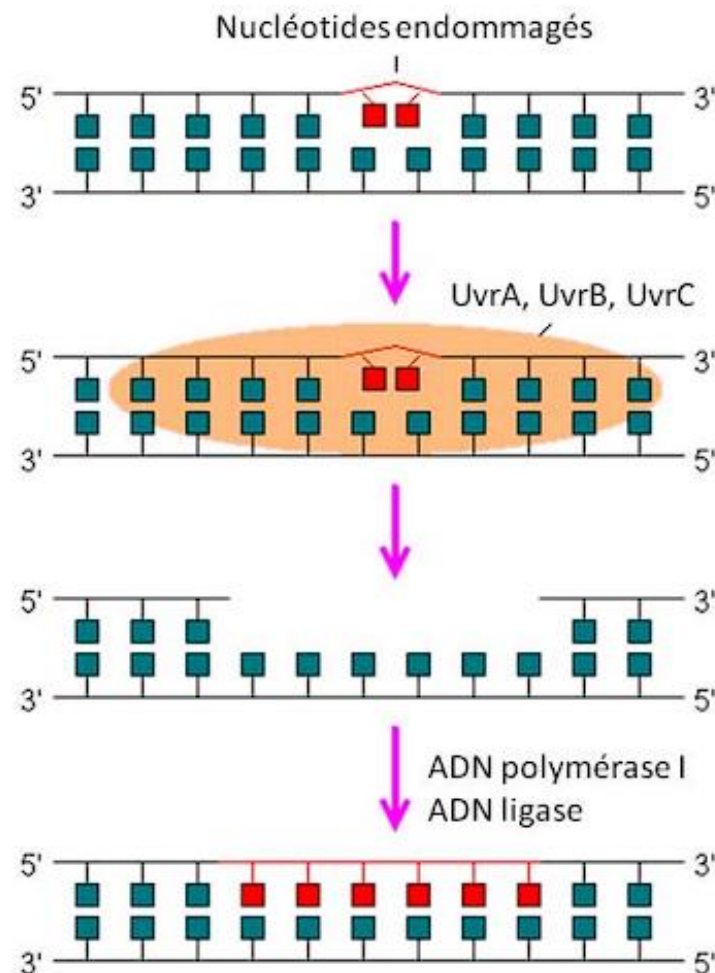


Figure 13 : Modèle de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER) chez *E. coli*. (Zhang, 2014)

II.2.5.3 Réparation des mésappariements

La réparation des mésappariements d'ADN corrige les erreurs qui ont échappé à l'activité de relecture des polymérase répliquatives, augmentant ainsi la fidélité de la réplication de deux à trois ordres de grandeur (**Iyer *et al.*, 2006 ; Li, 2008**)

Défauts dans l'adéquation des gènes de réparation entraînent une augmentation des taux de mutation et une instabilité génétique (**Peltomaki, 2005**)

Au-delà de la correction des erreurs de réplication, les protéines de réparation des mésappariements de l'ADN reconnaissent une variété de lésions de l'ADN et coordonnent la réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription, la recombinaison méiotique, le contrôle des points de contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose (**Buermeyer, *et al.*, 1999 ; Peltomaki, 2003**) La reconnaissance des lésions d'alkylation et des liaisons croisées intra brin par les protéines de réparation des mésappariements entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose lorsque les dommages sont trop importants. À leur tour, les cellules tumorales déficientes en réparation des mésappariements sont très résistantes au traitement avec des agents alkylants en raison de leur incapacité à induire l'apoptose. (**Fink *et al.*, 1998 ; Li, 1999**)

II.2.5.4 Réparation par recombinaison homologue

La réparation de l'ADN par recombinaison est un mécanisme essentiel qui permet de réparer les dommages importants survenant au niveau de l'ADN, tels que les cassures double-brin. La recombinaison homologue est la voie principale de réparation de l'ADN par recombinaison, et elle implique l'utilisation d'une séquence d'ADN identique ou similaire comme matrice pour restaurer l'intégrité de l'ADN endommagé. Dans ce processus, les cassures double-brin sont reconnues et signalées par des protéines spécifiques, qui recrutent ensuite des enzymes de recombinaison. Ces enzymes permettent la recherche et l'appariement d'une séquence d'ADN homologue, généralement présente sur le chromosome sœur ou sur un autre chromosome homologue. L'ADN endommagé est ensuite aligné avec l'ADN homologue, et une migration de brin a lieu pour permettre l'échange de matériel génétique entre les deux brins d'ADN. Finalement, les brins d'ADN sont liés et la structure de l'ADN est rétablie. Ce mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison est essentiel pour prévenir la perte d'information génétique, maintenir la stabilité chromosomique et prévenir la formation de mutations potentiellement dangereuses. Il joue un rôle crucial dans la réponse aux dommages de l'ADN, notamment dans la réparation des cassures double-brin

induites par des agents mutagènes tels que les rayonnements ionisants. (**San Filippo *et al.*, 2008**).

II.2.5.5 Réparation par recombinaison non homologue (NHEJ)

La réparation de l'ADN par recombinaison non homologue, également connue sous le nom de recombinaison de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), est un mécanisme de réparation de l'ADN qui intervient lorsque les cassures double-brin de l'ADN ne disposent pas de séquences d'ADN homologues appropriées pour servir de modèles de réparation. Contrairement à la recombinaison homologue, qui utilise des séquences d'ADN similaires, la recombinaison non homologue permet une réparation rapide mais souvent moins précise. Dans la recombinaison non homologue, les extrémités des cassures double-brin sont réunies directement sans l'utilisation de séquences d'ADN homologues. Ce processus implique une série d'étapes, y compris la reconnaissance des extrémités cassées par des protéines spécifiques, l'élimination des groupes chimiques indésirables, l'alignement approximatif des extrémités et leur ligation par des enzymes telles que la ligase IV. Il peut également impliquer l'ajout ou la perte de quelques bases d'ADN lors de la réparation, ce qui peut entraîner des altérations de la séquence génomique. (**Lieber, 2010**)

La réparation de l'ADN par recombinaison non homologue est un mécanisme important pour maintenir l'intégrité de l'ADN dans des conditions où les séquences homologues ne sont pas disponibles ou lorsque la réparation rapide est essentielle pour la survie cellulaire. Cependant, en raison de sa nature moins précise, la recombinaison non homologue peut également conduire à des mutations ou à des réarrangements génomiques indésirables. (**Lieber, 2010**)

CHAPITRE III

Matériel et Méthodes

Le but du travail est l'exposition des souches identifiées au rayonnement ultraviolet pendant des périodes de temps différentes pour établir une courbe de mortalité à chaque souche.

III.1 Problématique

L'intensité de l'agent mutagène, tel que les rayons UV, les agents chimiques mutagènes, ou les radiations ionisantes, peut avoir un impact sur la fréquence des mutations chez les bactéries. Des niveaux plus élevés d'exposition à ces agents peuvent entraîner une augmentation de la mutagénèse (Sikora *et al.*, 2020). Alors, quel est l'effet du rayonnement ultraviolet sur la fréquence de croissance bactérienne.

III.2 Cadre d'étude

Ce travail a duré environ deux mois, l'étude a été menée au sein du laboratoire de recherche microbiologie et biologie végétale universitaire de Mostaganem.

III.3 Origine des isolats

Les échantillons microbiologiques utilisés dans cette étude proviennent du Laboratoire de Recherche "Microbiologie" de l'université de Mostaganem. Après avoir été isolées, deux souches bactériennes identifiées ont été sélectionnées pour l'étude. Ces souches *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ont ensuite été purifiées avant d'être utilisées dans les expérimentations.

Escherichia. coli : hôpital militaire de Béchar Code : ATCC 25922

Pseudomonas Aeruginosa : institut pasteur Code : ATCC 27253.

III.4 Les milieux de cultures

III.4.1 Les milieux solides

Les milieux solides sont des supports de culture utilisés en microbiologie pour la croissance et l'isolement des micro-organismes. C'est un gel qui est à l'état solide à une température de moins de 60 °C et qui se liquéfie à 100 °C. Ils sont caractérisés par leur consistance ferme ou gélatineuse après solidification grâce à l'agar-agar. Les milieux solides offrent une surface stable et plane pour la croissance des micro-organismes, facilitant l'observation des caractéristiques coloniales et la réalisation de tests.

III.4.2 MacConkey

Le milieu utilisé pour isoler et dénombrer les coliformes, en particulier *Escherichia coli*, lors du contrôle de la contamination microbienne des produits non obligatoirement stériles, a employé le principe de fermentation du lactose par ces bactéries, se traduisant par la formation de colonies de couleur rouge brique. **(Voir annexe 1)**

Afin d'inhiber les bactéries Gram positives, le milieu a été enrichi en sels biliaires et en cristal violet.

- Les colonies "lactose négatives" sont de couleur incolore.
- Les colonies "lactose positives" se présentent sous forme de colonies de couleur rouge brique, parfois entourées d'un halo opaque de sels biliaires précipité

III.4.3 VRBG

Le milieu utilisé pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries dans les produits alimentaires a été basé sur l'aptitude des Enterobacteriaceae à fermenter le glucose. La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires a rendu le milieu inhibiteur vis-à-vis des bactéries Gram positives et de certaines bactéries Gram négatives. Le rouge neutre a été utilisé comme indicateur de pH.

Après 24 heures d'incubation, les colonies typiques d'Enterobacteriaceae ont été dénombrées sur des boîtes comprenant entre 15 et 150 colonies. Les Enterobacteriaceae ont formé des colonies roses-rouge (Glucose +) ayant un diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm, avec ou sans zone de précipitation de la bile. **(Voir annexe 2)**

III.4.4 King B

Le milieu de King B est utilisé pour détecter la présence de la pyoverdine, un pigment produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas*. Combiné avec le milieu de King A qui permet de détecter la pyocyanine, il facilite l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. La présence de sulfate de magnésium fournit les cations nécessaires pour activer la pyoverdine, ce qui entraîne une coloration vert-jaune fluorescente du milieu de culture. Par ailleurs, la présence de phosphate inhibe la production de pyocyanine, un pigment spécifique à *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, la synthèse de pyoverdine se traduit par une coloration verte fluorescente du milieu de culture. **(Voir annexe 3)**

III.5 Les milieux liquides

III.5.1 Bouillon King A

Le bouillon King A suit le même principe que la gélose King A. C'est un milieu de culture liquide utilisé pour la détection et l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. La principale différence est l'absence de l'agar dans le bouillon King A (forme liquide) Dans les deux cas, le principe fondamental est favorisé la production de pigments caractéristiques par *Pseudomonas aeruginosa*. **(Voir annexe 4)**

III.5.2 Bouillon nutritive

Le bouillon Nutritive est un milieu liquide qui favorise la croissance des bactéries non exigeantes grâce à ses substances nutritives. Il peut être enrichi avec divers ingrédients et utilisé pour la recherche de sensibilité aux antibiotiques. La présence de bactéries dans le milieu peut être observée par une augmentation de la turbidité. **(Voir annexe 5)**

III.6 Technique d'étude

III.6.1 L'ensemencement

La méthode d'ensemencement est réalisée comme Suit, Trois milieux de culture (VRBG, MacConkey, King B) sont préparés en surfusion à une température de 45°C. Ensuite, ces milieux sont versés dans des boîtes de Pétri de 90 mm, avec 18 ml par boîte, puis laissés refroidir. Chaque boîte estensemencée en quadrant avec une anse de platine en déposant une goutte de la solution mère préalablement préparée. Une fois les boîtesensemencées, elles sont placées en incubation aérobie à une température de 37°C pendant une période de 24 heures. Après l'incubation, les boîtes sont examinées. **(Figure 14)**

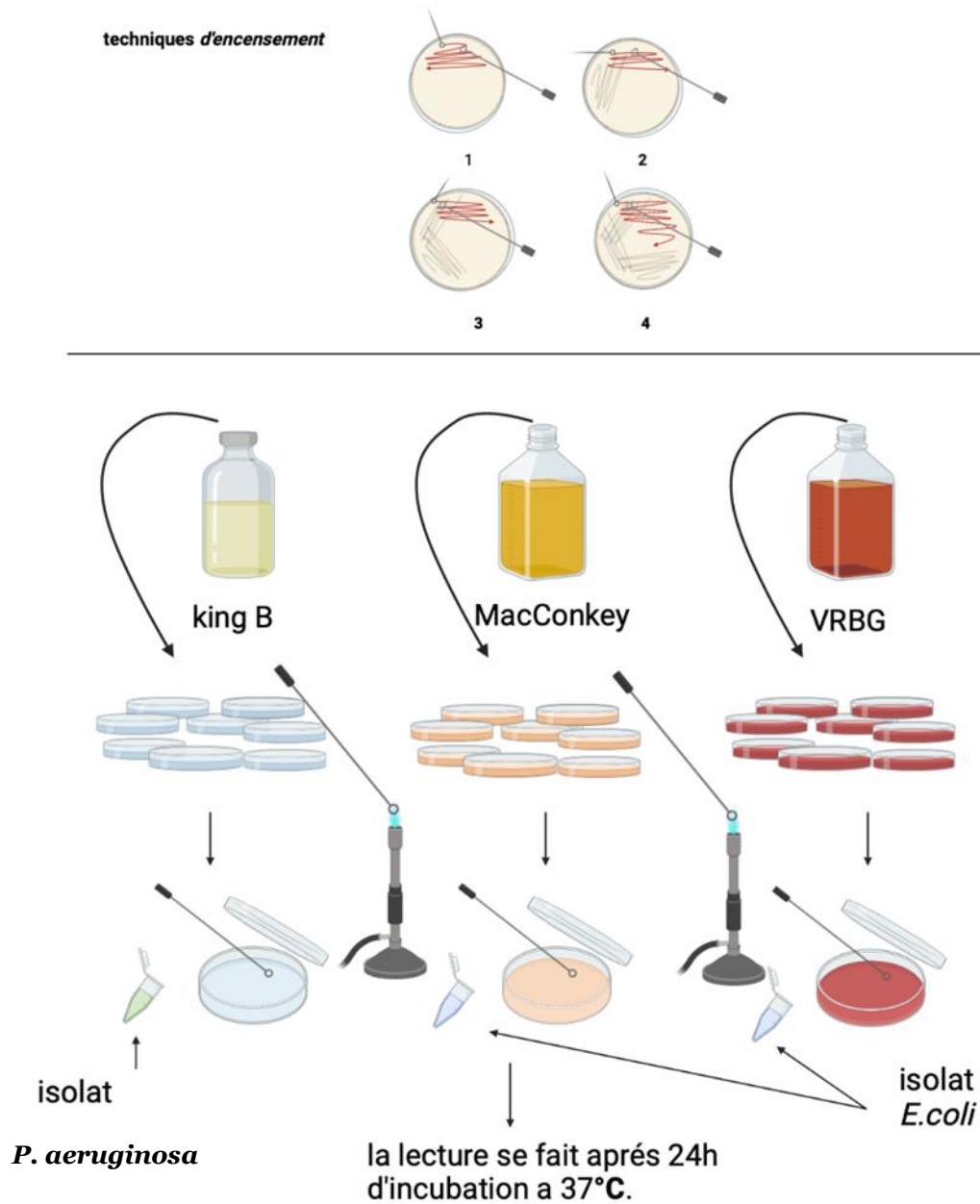


Figure 14 : Schéma L'ensemencement des deux isolats *E coli* et *P aeruginosa* dans 3 différentes milieu de culture.

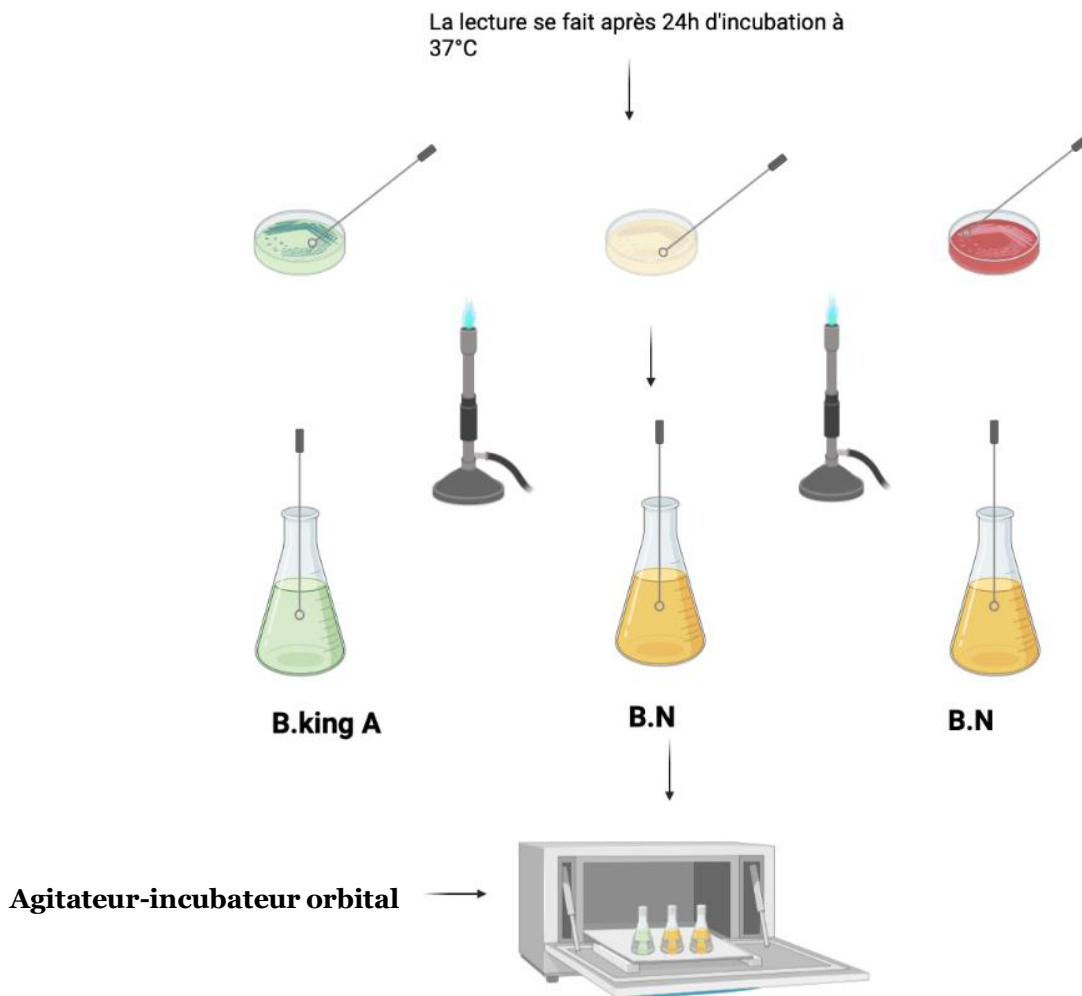
III.6.2 Le repiquage

Le repiquage des colonies est une technique permettant de transférer sélectivement une seule colonie de bactéries, de levures ou d'autres micro-organismes d'un milieu de culture initial vers un nouveau milieu stérile.

Matériel et Méthodes

Dans cette étude en repique une seule colonie isolée et représentative de la souche *E. coli* à l'aide d'une anse de platine stérilisée dans un rayon de 30cm autour de la flamme d'un bec bunsen et poser la dans le bouillon nutritif stérile, en incube le bouillon dans un Agitateur-incubateur orbital à 37 °C et faire tourner à 160 tr/min pendant 24h (**Figure 15**).

On fait le même principe avec la souche de *Pseudomonas auerginosa* dans un bouillon King.



remarques:

- 1.on ne prend qu'une seule colonie pour mélanger avec le B.N
- 2.laisser dans l'orbital incubateur agitateur 24h
- 3.les B.N utiliser sans stérilisé avant l'étape

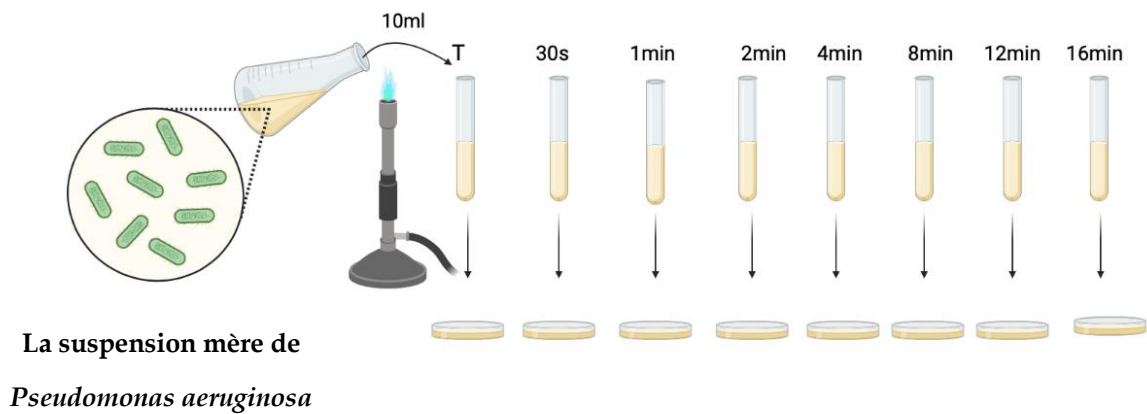
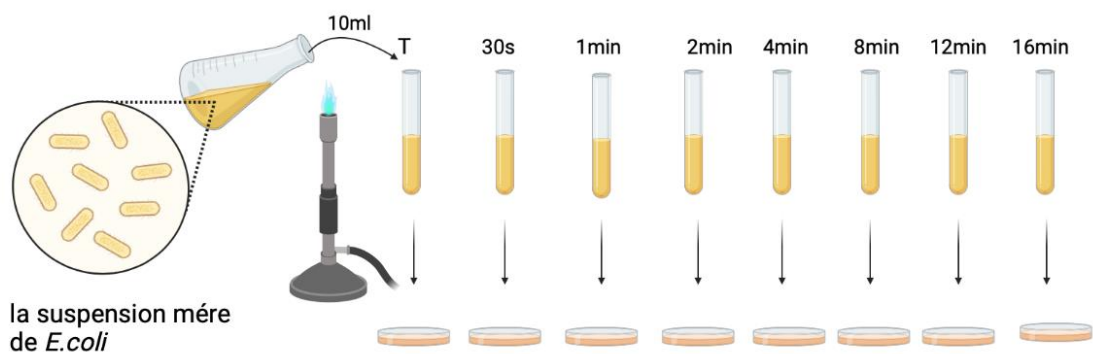
Figure 15 : Schéma de repiquage des colonies.

Matériel et Méthodes

Après que la concentration microbienne dans la suspension mère (BN + *E. coli*) a été mesurée, les échantillons ont été placés dans 8 tubes stériles, chacun contenant 10 ml. Ensuite, le contenu de chaque tube a été mis dans une boîte de Pétri et exposé individuellement aux rayons UV. Sur chaque boîte, la durée d'exposition à l'UV a été indiquée (0s, 30s, 1min, 2min, 4min, 8min, 12min, 16min).

On fait le même principe pour la suspension mère (bouillon King A + *Pseudomonas aeruginosa*)

Le protocole suivant est utilisé pour effectuer le travail :



III.6.3 Exposition au rayon ultraviolet

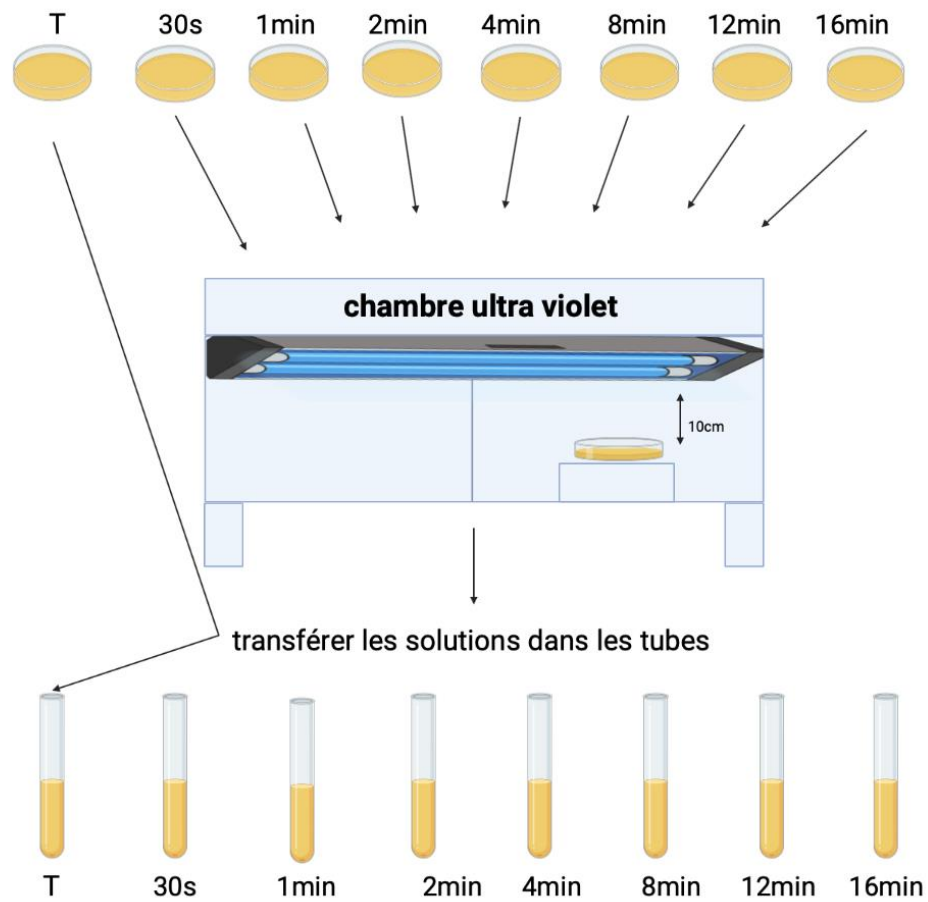
La mutation par exposition aux rayons UV est un phénomène bien connu dans le domaine de la génétique et de la biologie moléculaire. Les rayons UV peuvent endommager l'ADN en provoquant des cassures de brins et des liaisons anormales entre les bases nucléotidiques. Ces lésions de l'ADN peuvent entraîner des mutations ponctuelles, des délétions ou des duplications génétiques. (Friedberg *et al.*, 2006).

- Principe

Les rayonnements UV sont des ondes électromagnétiques de 100 à 400 nm de longueur d'onde. La longueur d'onde émise détermine leur efficacité germicide. Les UVC les plus efficaces sont ceux de 200 à 280 nm. La dose absorbée par les micro-organismes détermine l'efficacité des rayons UV. Le produit de l'intensité UV par le temps d'exposition des germes aux rayonnements détermine la dose. (Figure 16)

Les isolats étaient irradiés dans une chambre à UV en plexiglass (46 x 15 x 30 cm) couverte de papier d'aluminium qui contenait la source de lumière UV à 254 nm (lampe germicide 15 W NIS) fixé au sommet de la chambre (voir annexe 6) la distance entre les isolats et la lampe UV est 10cm, toutes les boîtes ont été irradiées sauf la boîte de T (0).

Afin d'éviter la photo réactivation, tous les tubes ont été enveloppés de papier aluminium après l'irradiation. (Figure 17,18)



Remarque :
1 la boîte T (0) ne rentre pas dans la chambre UV
2 toutes les autres tubes sont revetus d'aluminium

Figure 16 : Schéma présente le protocole d'Exposition de suspensions au rayon ultraviolet.



Figure 17 : les tubes de la suspension mère de *E. coli* après l'irradiation de UV.



Figure 18 : les tubes de la suspension mère de *Pseudomonas aeruginosa* après l'irradiation de UV.

III.6.4 Dilution et étalement

- Dilution décimale

Suite à l'exposition aux rayons UV, des dilutions décimales sont préparées conformément au protocole suivant.

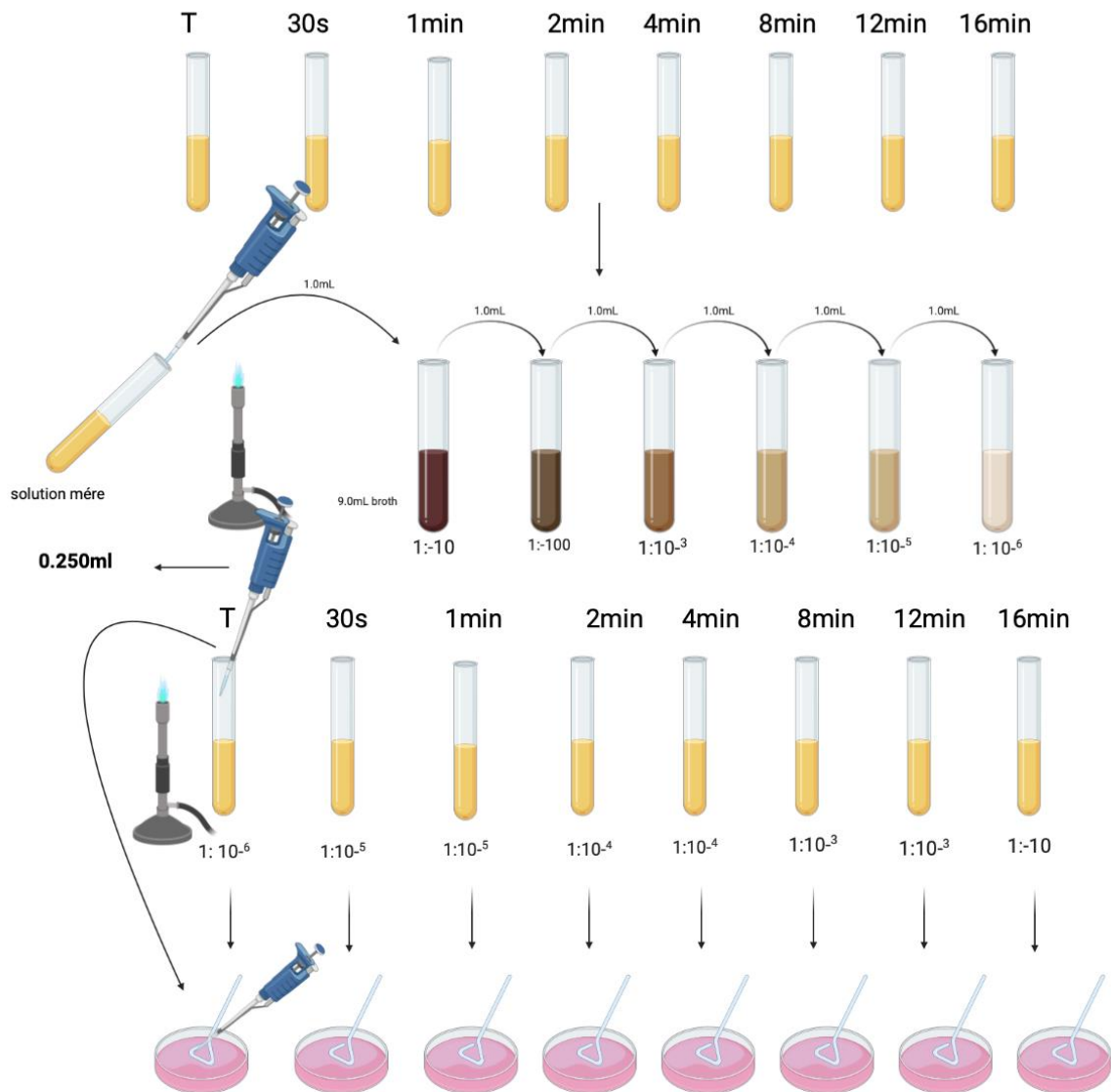


Figure 19 : Protocole de dilution décimale et étalement

Dilutions établies pour chaque traitement

T :10⁻⁶ / 30s :10⁻⁵ / 1min :10⁻⁵ / 2min :10⁻⁴ / 4min :10⁻⁴ / 8min :10⁻³ / 12min :10⁻³ /16min :10⁻¹.

Matériel et Méthodes

Les étapes sont réalisées de la même manière pour les deux isolats, en suivant le même principe.

- Les tubes ont été préparés pour la dilution, chaque tube a contenu 9 ml d'eau physiologique. **(Figure 19)**

Ensuite, dans un rayon de 30 cm autour de la flamme d'un bec bunsen à l'aide d'une micropipette en pose 0,25 ml de chaque diluant et inoculé sur la gélose nutritive avec un étaleur forme râteaux stérile et incubé à 37 °C pendant 24 h, pour déterminer la viabilité des bactéries. Les colonies sont exprimées en UFC/ml

IV. Résultats

IV.1 Aspect macroscopique

Sur les milieux de culture MacConkey et VRBG les colonies de *Escherichia coli* apparaissent des couleurs rose sur le VRBG et pas de couleur sur MacConkey et Le milieu de culture King A les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* se présenter un couleur vert vif.

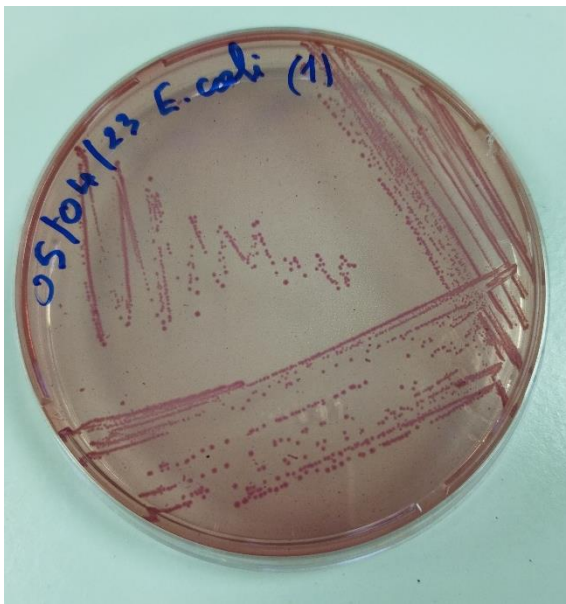


Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies d'*Escherichia coli* sur gélose VRBG.

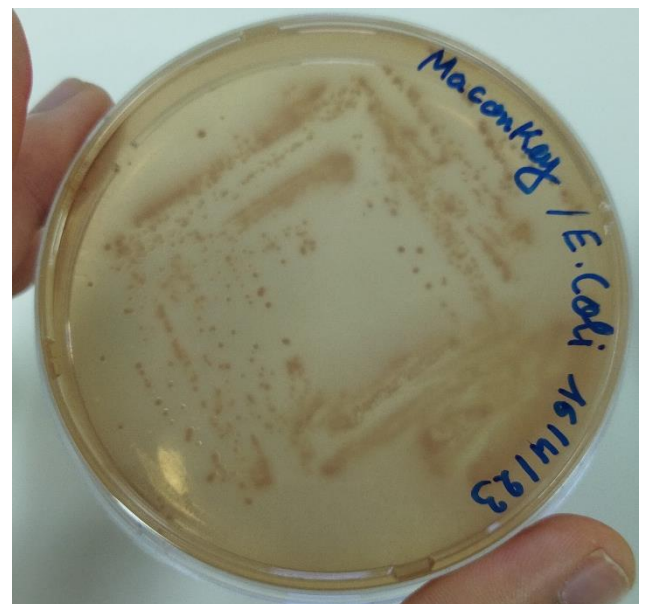


Figure 21 : Aspect macroscopique des colonies d'*Escherichia coli* sur gélose MacConkey.



Figure 22 : Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose King A.

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

Après une période d'incubation de 24 heures et l'observation des boîtes de Pétri, les données recueillies ont permis de créer une courbe de mortalité des bactéries. Ces résultats démontrent l'effet délétère des rayons UV sur la survie des bactéries. En effet, plus la durée d'exposition aux rayons UV est longue, moins le nombre de colonies bactériennes observées est élevé. **(Figure 24,26)**

Les dilutions ont été préparées après avoir exposé les souches d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* à différentes durées d'exposition aux rayonnements ultraviolets (0, 30 secondes, 1 minute, 2 minutes, 4 minutes, 8 minutes, 12 minutes et 16 minutes) afin de créer des courbes de survie. Ensuite, un volume précis de 0,25 ml pour chaque isolat a été étalé sur un milieu de culture. La quantité exacte de rayonnement directement exposé aux cellules était inconnue car le dispositif de surveillance UV n'était pas disponible. Par conséquent, la seule variable que nous pouvions contrôler était la durée d'exposition aux UV.

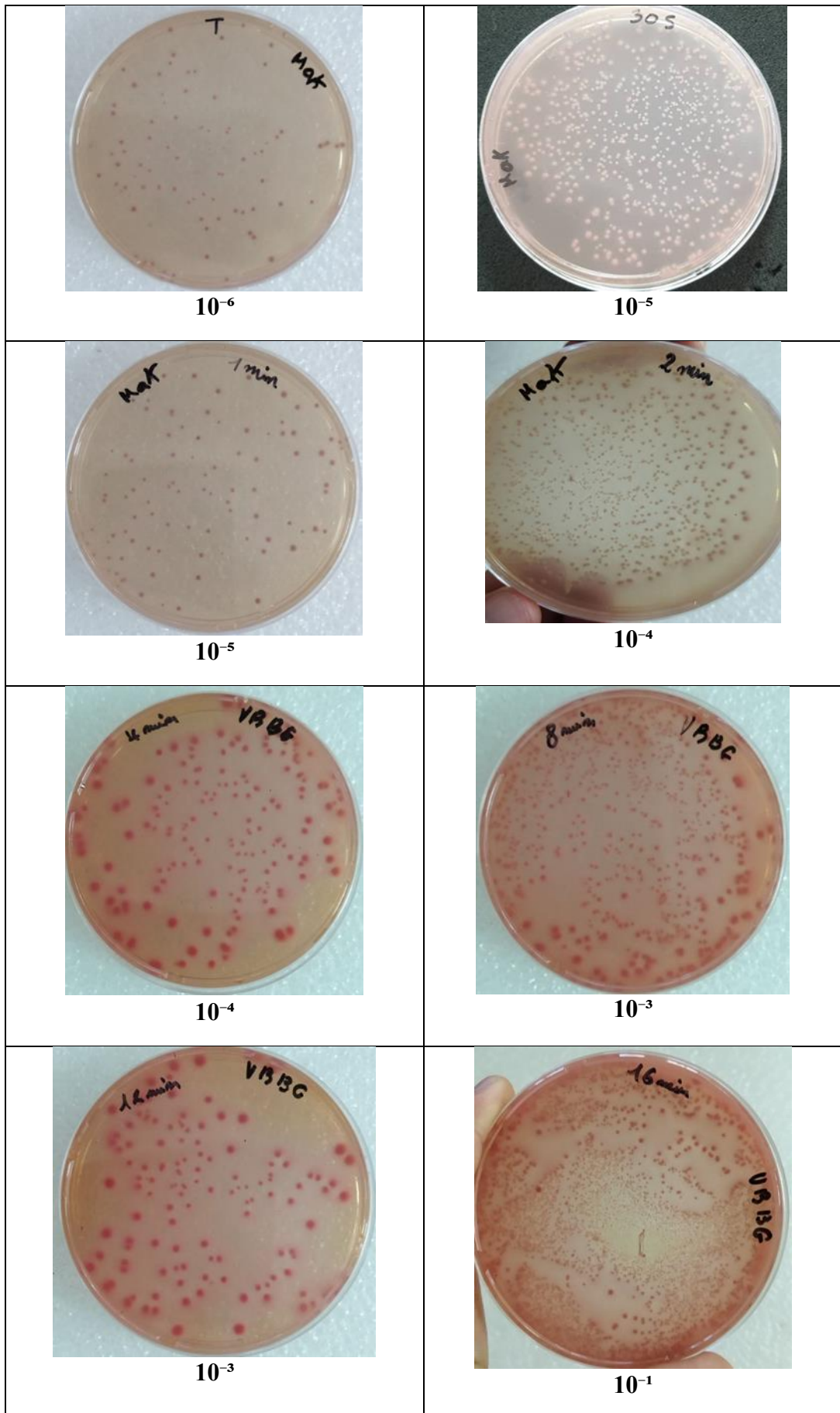


Figure 23 : la croissance bactérienne d'*Escherichia coli* après l'irradiation par UV a différents déluitions.

Résultats

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

Temps	T (0)	30s	1min	2min	4min	8min	12min	16min
N colonies	128	612	101	753	173	829	119	734
Survive (UFC /ml)	128×10^6	612×10^5	101×10^5	753×10^4	173×10^4	829×10^3	119×10^3	7340
Pourcentage %	100	47,81	7,89	5,88	1,35	0,64	0,09	0,005

La courbe de mortalité de la souche *Escherichia coli* est illustrée à la figure 25, et il est évident que la dose mortelle LD95 est d'environ 2 minutes d'exposition. 95 % des cellules d'*Escherichia coli* ont été tuées après avoir été exposées aux rayons UV pendant 2 minutes. L'exposition dure environ 30 secondes et la dose LD50 est mortelle. 50 % des cellules d'*Escherichia coli* ont été tuées après 30 secondes d'exposition aux rayons UV.

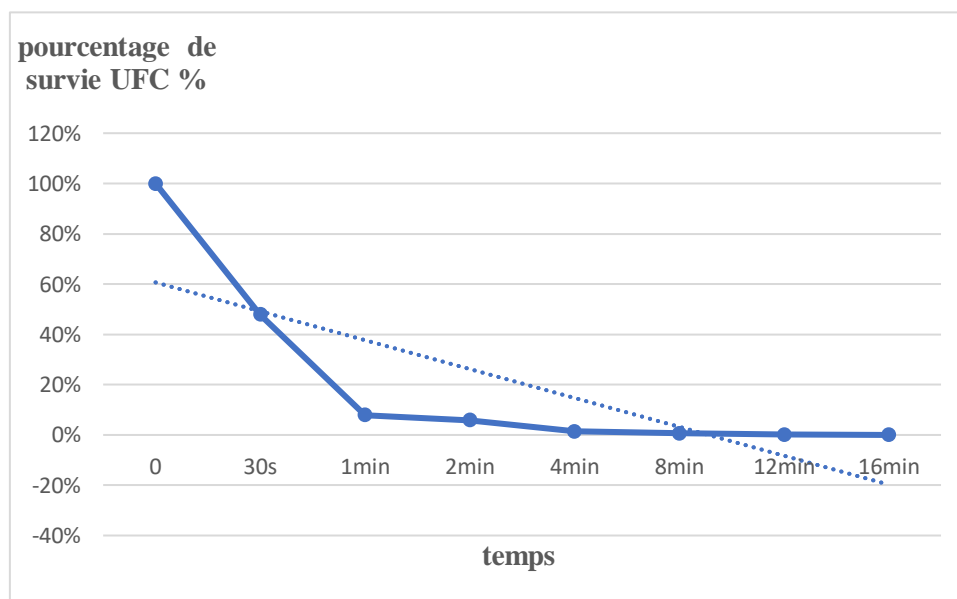


Figure 24 : la courbe de mortalité de la souche *Escherichia coli*.

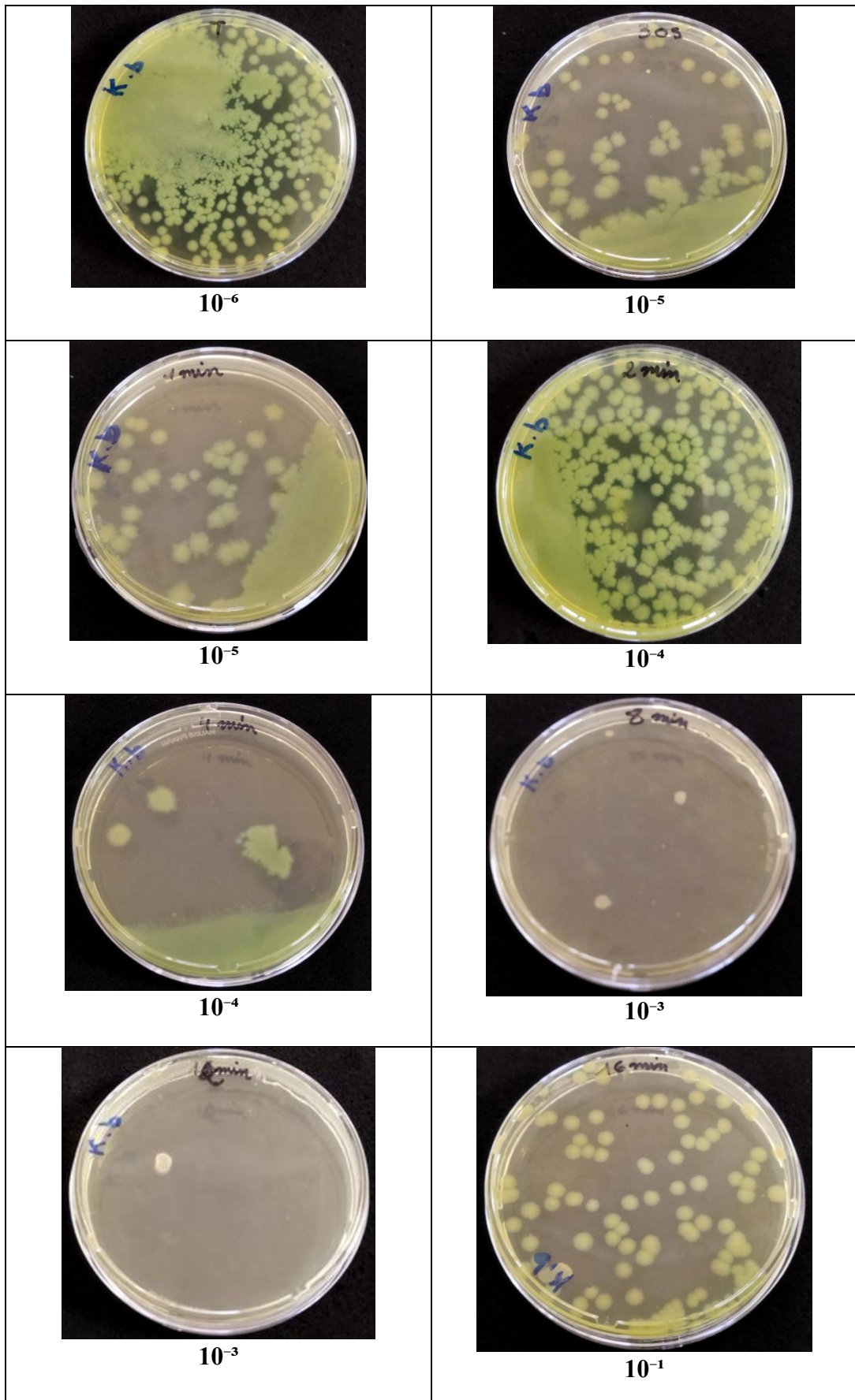


Figure 25 : La croissance bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* après l'irradiation par UV a différents déluions.

Résultats

Tableau 5 : Le nombre de colonies en UFC / ml chez *Pseudomonas aeruginosa* après l'exposition à l'UV à différents temps.

Temps	T (0)	30s	1min	2min	4min	8min	12min	16min
N colonies	≥500	≥200	≥150	≥300	≥60	5	1	≥150
Survive (UFC /ml)	500x10 ⁶	200x10 ⁵	150x10 ⁵	300x10 ⁴	60x10 ⁴	5x10 ³	1000	150
Pourcentage %	100	4	3	0,6	0,12	0,001	0,0002	0,00003

La figure 26 montre la courbe de mortalité de la souche *Pseudomonas aeruginosa*. La durée de l'exposition était d'environ 30 secondes et la dose de LD95 était mortelle. Après 30 secondes d'exposition aux rayons ultraviolets, 95 % des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ont péri. et la dose létale LD 50 de cette bactérie environ 15s c'est à dire 50 % de cellule de *pseudomonas aeruginosa* ont été morte après 15 secondes d'exposition aux rayons UV.

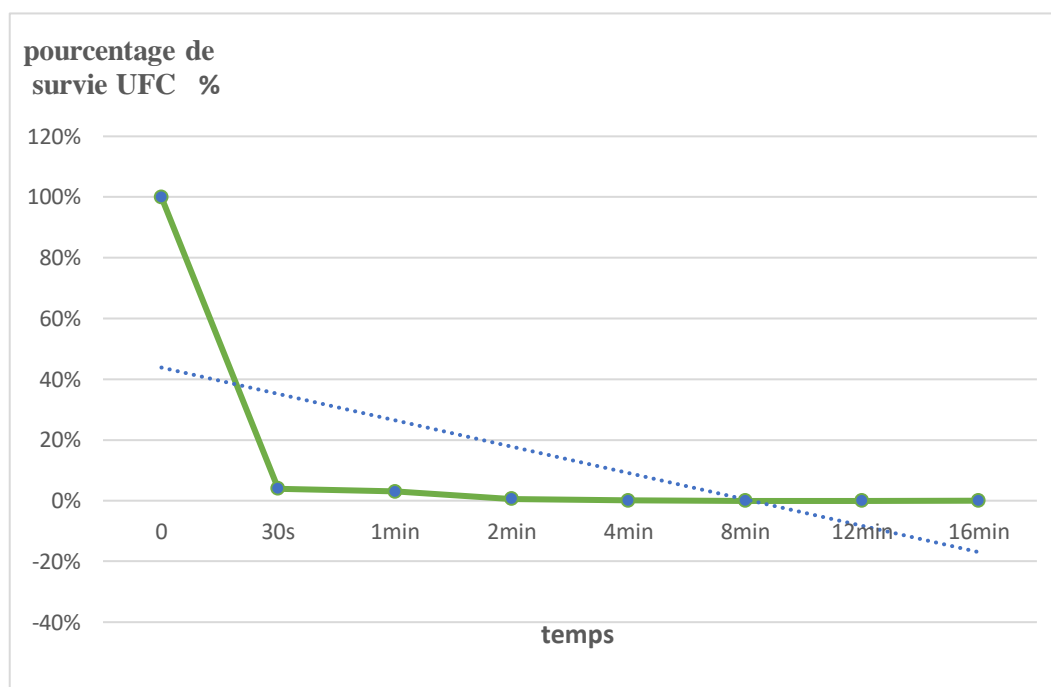


Figure 26 : la courbe de mortalité de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

V. Discussion

Dans cette expérience, les effets du rayonnement UV sur deux souches bactériennes *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, dans les résultats des (**figure 24 et 26 et des tableaux 4 et 5**) mettent en évidence une diminution des taux de survie des deux isolats à mesure que la durée d'exposition augmente. Pour *Escherichia coli*, le pourcentage de survie a chuté de manière significative, passant de 100% à 47,81% après 30 secondes et d'exposition aux rayons UV à une distance de 10cm de la lampe. De même, pour *Pseudomonas aeruginosa*, le pourcentage de survie est tombé à seulement 4% après la même durée et à la même distance d'exposition, et respectivement 0,64% et 0,0002% après 12min de traitement.

Une tendance similaire a été observée dans une étude menée par **Chibani et al., (2017)**, dans laquelle une augmentation du temps d'exposition aux rayons UV a été associée à une diminution de la capacité de survie. Ils ont découvert que lorsqu'ils ont été exposés aux rayons UV à une distance de 10 cm, le pourcentage de survie de *Bacillus sp* et de *Micrococcus varians* a diminué de 100% à 15,07% et 37,62% respectivement après 3min d'exposition .et selon l'étude de **kodoth et Jonse, (2015)** ils ont été comparer le nombre d'UFC sur des plaques exposées aux UV pendant 24 et 48 heures à celui des plaques témoins de *Escherichia coli*. Et prédit qu'il y aura moins d'UFC sur les plaques exposées à la lumière UV pendant des durées variables par rapport à la plaque témoin, une autre étude se fait par **Celio, (2018)** sur le temps nécessaire d'exposition aux rayons ultraviolets tuera *Escherichia coli*. Il a exposé des boîtes de Pétri de bactéries *E. coli* à différents moments (5 seconds, 30 seconds, 1 minute, 5 minutes et 15 minutes) a une distance de 15cm, il a trouvé que le rayonnement UV a tué la plupart des *E. coli* en 15 minutes d'exposition. Cependant, le rayonnement UV a à peine affecté *E. coli* dans les 15, 30 et 60 secondes d'exposition.

En proportion de **Cottaz et al., (2008)** ils ont exposé une lumière ultra-violets de 254 nm sur les microorganismes pendant 45 secondes à une distance de 2cm de contamination de la tomate parmi ces organismes *Escherichia coli* elle a trouvez que La souche d'*E. coli* testée est sensible aux UV (de 74 à 99 % d'inhibition) l'inhibition est croissante avec le temps d'application aussi avec des études de **Abshire et Dunton, (1981)** , **Zelle et Hollaender, (1955)** ont rapporté qu'une dose d'UV de 550 ergs/mm² inhibait la formation de colonies de *P. aeruginosa* de 90 %.

Fernandez et Pizarro, (1996) dans une étude présentaient une sensibilité dose-dépendante marquée au rayonnement UVA lorsqu'elles étaient cultivées dans un bouillon LB à 37°C, une survie d'environ 20% a été trouvée lorsque les suspensions ont été exposées pendant 60 min.

Dans **les tableaux (4 et 5)** ont observé que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* était très sensible à UV que la souche d'*Escherichia coli* dans un pourcentage de 4% et 47,81% respectivement après 30 secondes d'exposition au rayon ultra-violet et 0,0002% , 0,64% après 12 min d'exposition , une autre tendance de **Simonson et al., (1990)** trouvez que La comparaison des coefficients de sensibilité aux UV a révélé que les souches de *P.aeruginosa* étaient environ dix fois plus sensibles à l'irradiation UV que le type sauvage *E. coli*.

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

D'après **Witkin, (1976) ; Franklin et al., (1985) et Kunz et Glickman, (1984) et Miller et al., (1999)** une variété d'organismes, y compris les bactéries, ont été montrés être affectés mortellement par le rayonnement UV. Les dimères de pyrimidine sont généralement considérés comme des lésions de l'ADN causées par le rayonnement ultraviolet.

Dans une autre étude de **Blatchley et Peel, (2001)** qui montre que l'inactivation d'*E. coli* affiche un maximum à 270 nm, avec une réduction de population de 0,43 log par mJ/cm² Aucune inactivation mesurable n'est observée au-dessus de 300 nm. La sensibilité à la longueur d'onde d'*E. coli* correspond bien aux spectres d'absorption des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN Cela confirme que l'absorption des rayons ultraviolets par les dimères de pyrimidine dans l'ADN induit une liaison covalente et inhibe la réplication cellulaire, qui est la principale raison pour laquelle les micro-organismes sont inactivés par le rayonnement ultraviolet. Ce qui confirme que le nombre de colonies a diminué en raison de l'exposition aux UV.

Conclusion et perspectives

Premièrement, il a été démontré que les UV pouvaient inhiber efficacement les deux souches bactériennes étudiées. La diminution significative du nombre de cellules viables à la suite de l'irradiation UV suggère que cette méthode peut être utilisée pour la désinfection de l'eau et des surfaces contaminées par ces bactéries.

Deuxièmement, il a été découvert que la réaction des deux souches bactériennes à l'exposition aux rayons ultraviolets était différente. *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélée plus sensible aux rayonnements ultraviolets, montrant un nombre de cellules viables inférieur à celui d'*Escherichia coli*. La présence de systèmes de réparation de l'ADN plus ou moins efficaces ou des caractéristiques intrinsèques des bactéries, telles que leur épaisseur de paroi cellulaire, pourraient expliquer cette différence de sensibilité.

Selon cette étude, les rayons UV ont un effet dévastateur sur les bactéries et sont également des agents physiques qui aident à stériliser et à tuer les bactéries. L'intensité de la tolérance au rayonnement ultraviolet varie selon les bactéries. Cette étude a permis de calculer la courbe de mortalité pour les deux souches.

L'étude des courbes a révélé que les deux souches avaient un rapport de dose létale de LD₉₅, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que les bactéries soient exposées à la lumière UV pour tuer 95 % des cellules.

Malgré les avantages potentiels de cette méthode, il y a des limites à prendre en compte. Pour évaluer l'efficacité des UV dans des conditions environnementales réalistes, des études supplémentaires sont nécessaires en tenant compte de variables telles que la diversité des souches bactériennes. De plus, il est important de prendre en compte la faisabilité économique et la durabilité environnementale de l'utilisation des UV en tant que méthode de traitement.

Enfin, l'étude de l'effet des UV sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* a démontré l'efficacité de cette méthode de traitement. Cependant, une recherche continue dans ce domaine est nécessaire pour utiliser pleinement les rayons UV en tant qu'outil de désinfection sûr, efficace et respectueux de l'environnement pour lutter contre la propagation de ces bactéries pathogènes et améliorer la santé publique.

Références bibliographiques

- **Abshire R. L., & Dunton H.,** (1981). Resistance of selected strains of *Pseudomonas aeruginosa* to low-intensity ultraviolet radiation, *Applied and Environmental Microbiology*, 41(6), 1419–1423. <https://doi.org/10.1128/aem.41.6.1419-1423.1981>
- **Alauzet C.,** (2009), Taxonomie des bactéries anaérobies de la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes, thèse de doctorat, université de henri poincare, Nancy, 391p.
- **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Walter P.,** (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; Section 5.1, DNA Is the Genetic Material. 712 p.
- **Allet M., Adaouri A., Benelkadi N., Meddane F Z., Benhebbadj S.,** (2013) Agents mutagènes. [Diapositive]. Présentation sur la Mutagenèse, Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene, Bab Ezzouar.
- **Amairi T.,** (2021), Résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés des abattoirs et élevages de poulet de chair au Nord-Est d'Algérie, thèse de doctorat, Université Mohamed Khider de Biskra, 123p
- **Anonymous.,** (1996), Microbiological Specifications for Foods *Escherichia coli*. In ICMSF (Ed.), *Microorganisms in Foods: Characteristics of Microbial Pathogens* (pp. 217-264). Blackie Academic & Professional.
- **Atlas R. M.,** (2010), *Handbook of microbiological media*. CRC Press.
- **Batra S.,** (2018), Morphology and Culture Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). *Paramedics World*. Retrieved from https://paramedicsworld.com/pseudomonas-aeruginosa/morphology-culture-characteristics-of-pseudomonas-aeruginosa/medical-paramedical-studynotes?fbclid=IwAR1CJa_Z5N6pdIMVAthEn3Pqus1fVpdC5Y1qR5hS56S9PCCnaoYclUeg15g
- **Benelmili S.,** (2021), Etude du profil bactériologique et de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du CHU de Constantine, Thèse de doctorat, Université Frères Mentouri Constantine 1, 125p
- **Bergey D.H., & Holt J.G.,** (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Baltimore, Williams & Wilkins. 787 p.
- **Bhardwaj S.K., Singh H., Deep A., Khatri M., Bhaumik J., Kim K., & Bhardwaj N.,** (2021). UVC-based photoinactivation as an efficient tool to control the

- transmission of coronaviruses. *Science of the Total Environment*, 792, 148548.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148548>
- **Bhattacharya A., Nayar R., Kheruka S.C., & Tripathy S.,** (2021). Ionizing Radiation. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557504/>
 - **Blatchley III E.R. & Peel M.M.,** (2001). Disinfection by ultraviolet irradiation. In S.S. Block (Ed.), *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (pp. 823-851). Lippincott Williams & Wilkins.
 - **Braga R.M., Dourado M.N., & Araújo W.L.,** (2016). Microbial interactions: Ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 86-98.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
 - **Brash DE. et al.,** (1991) A role for sunlight in skin cancer : UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 10124–10128.
 - **Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R.,** (1957), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, seventh edition, 1130p.
 - **Buermeyer A.B., Deschenes S.M., Baker S.M., & Liskay R.M.,** (1999). Mammalian DNA mismatch repair. *Annual Review of Genetics*, 33, 533-564.
 - **Burgers P.M.J, Kunkel T.A.,** (2017), Eukaryotic DNA replication fork. *Annu Rev Biochem.* 86: 417-438.
 - **Canada Agence Canadienne D'inspection Des Aliments., G** (2020, November 13). T-4- 126 – Identification et classification taxonomique des micro-organismes présentés pour usage comme suppléments en vertu de la Loi sur les engrais.
<https://inspection.canada.ca/protection-des-vegetaux/engrais/circulaires-a-la-profession/t-4-126/fra/1346524491267/1346527009874>
 - **Celio J.G.,** (2018). How Much Time of Exposure to Ultraviolet Rays Will Kill E. coli ? [Summary of the project]. In *California Science & Engineering Fair 2018 Project Summary* (Project Number J1701).
 - **Chaker H.,** (2012). Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte implication des métabolites du tryptophane. Thèse de doctorat, université Grenoble France, 291 p.
 - **Chellat R.,** (2020-2021). Les mutation, genotoxicologie, Université Frère Mentouri - Constantine 1, 45P (1 – 6).

- **Chibani H.R, Fellahi S, Chibani A.,** (2017). Enhancement of protease production by *Bacillus* sp. And *Micrococcus varians* induced by UV-mutagenesis, *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*,2, ISSN : 2456-1878, <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.5.10>
- **Ciccarelli F.D., Doerks T., Von Mering C., Creevey C.J., Snel B., & Bork P.,** (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311(5765), 1283-1287.
- **Clark D., Pazdernik N.J., & McGehee M.R.,** (2019). *Bacterial Genetics*. In Elsevier eBooks (pp. 896–924). Retrieved from <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813288-3.00028-8>.
- **Clave D.,** (2011), fiche technique : *Pseudomonas aeruginosa*, Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU, Toulouse, 4p.
- **COHEN N. et KARIB H.,** (2006). Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : un réel problème de santé publique. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Les technologies de laboratoire. 1 : 5-9.
- **Collins F.S., Morgan M., & Patrinos A.,** (2003). The Human Genome Project : Lessons from large-scale biology. *Science*, 300(5617), 286-290.
- **Cooper G.M.,** (2000), *The Cell A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland 689p.
- **Cottaz A., Oulahal N., & Sebti I.,** (2008). Effet des ultra-violets sur les microorganismes de contamination de la tomate. ResearchGate.
- **Cottinet D.,** (2013), Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia Coli* étudiées en millifluidique digitale, these de doctorat, Université Pierre et Marie Curie de paris, 165p.
- **De Carufel K.,** (2008). Mutagenèse par la technologie du transposome chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mémoire présenté à l'Université du Québec à Trois-Rivières comme exigence partielle de la Maîtrise en Biophysique et Biologie Cellulaires ,9-10.
- **Delarras C.,** (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Lavoisier, Paris. P476

- **Demirci A., Ngadi M.O.,** (2012). Microbial decontamination in the food industry : Novel methods and applications. Woodhead publishing series in Food Science, Technology and Nutrition, n.234, 804p.
- **Diassana A.,** (2018), Identification des souches D'Escherichia coli dans les selles en rapport avec la malnutrition a dioro, thèse de doctorat, Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali, 94p
- **Dixit M., et Kumar A.,** (2018). Mutagenesis, Genetic Disorders and Diseases. In Assays and Applications for Mutagenicity (pp. 1-34). doi :10.1016/b978-0-12-809252-1.00001-8
- **Doe J.,** (2023). Principe de purification dans une souche bactérienne. Journal of Microbiology, 45(2), 123-140.
- **Duarte P.,** (2020, April 18). Pseudomonas aeruginosa, what is it, and what we can do to prevent contamination. Dupal UK.<https://www.antibacterialshower.co.uk/post-nk9zc/2020/04/18/pseudomonas>
- **Elazhary M.A., Saheb S.A., Roy R.S., & Lagacé A.,** (1973). A simple procedure for the preliminary identification of aerobic gram-negative intestinal bacteria with special reference to the Enterobacteriaceae. Canadian Journal of Comparative Medicine, 37(1), 43-46.
- **Fernández R.D., & Pizarro R.A.,** (1996). Lethal Effect Induced in Pseudomonas aeruginosa Exposed to Ultraviolet-A Radiation. Photochemistry and Photobiology, 64(2), 334–339. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb02467.x>
- **Fink D., Aebi S., & Howell S.B.,** (1998). The role of DNA mismatch repair in drug resistance. Clinical Cancer Research, 4(1), 1-6.
- **Fouad S.,** (2022), acide nucléique IN : Stockage De Données Numériques ADN, Un Milliard De Personnes Informées [French], 324P
- **Franklin W.A., Doetsch P.W., & Haseltine W.A.,** (1985). Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidine (6-4) photo-product. Nucleic Acid Research, 13, 5317-5325.
- **Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., & Ellenberger T.,** (2006). DNA Repair and Mutagenesis. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- **Furelaud G.**, (2003). La découverte de la structure de l'ADN. Planet-Vie. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/molecules/la-decouverte-de-la-structure-de-l-adn>
- **Goubau P.**, (2000) *Pellegrins E : Repères en microbiologie*, édition Garant. P : 391.
- **Graur D.**, (2003). Single base mutation. In *Nature Encyclopedia of the Human Genome* (pp. 287-290). Macmillan Pub Ltd, Nat Pub Grp.
- **Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., & Gelbart W.M.**, (2000). *Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.). W. H. Freeman. Chapter 4
- **GROSJEAN J. et PASQUIER C.**, (2009). *Bactériologie et virologie pratique*. 11ème édit De Boeck s.a, Bruxelles, p.128.
- **Hall B.G.**, (1995). Genetics of selection-induced mutations : I. *uvrA, uvrB, uvrC, and uvrD* are selection-induced specific mutator loci. *J. Mol. Evol.* 40, 86–93
- **Hanes D.**, (2003). Nontyphoid Salmonella. In: *Miliotis N., Bier J. (Eds.), International Handbook of Foodborne Pathogens* (pp. 137-149). Marcel Dekker : New York.
- **HAYES H.**, (2000), notion de base de génétique IN : *Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales*, INRA, Paris, 262p,15p.
- **Hobot J.A.**, (2015). *Bacterial Ultrastructure*. Dans Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00002-0>.
https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-functionwatson397/https://www.researchgate.net/publication/237594006_Effet_des_ultra-violets_sur_les_microorganismes_de_contamination_de_la_tomate
- **Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., & Modrich P. L.**, (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(2), 302-323.
- **Kashyap S., Maherchandani S., & Kumar N.**, (2014). Ribotyping. Dans Elsevier eBooks (pp. 327-344). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416002-6.00018-3>.
- **Kodoth, J. & Jonse M.**, (2015). The Effects of Ultraviolet Light on *Escherichia coli*, *Journal of Emerging Investigators*, New Jersey, 4P
- **Kodym A., & Afza R.**, (2003). Physical and chemical mutagenesis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 236, pp. 189–204).
- **Koutchma T.N., Forney L.J., Moraru C.I.**, (2009). *Ultraviolet light in food technology : Principles and applications*, CRC press, 261p.

- **Kunz BA, Glickman BW.,** (1984). UV radiation-induced pyrimidine dimers in chromosomal DNA of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(7), 2009-2013.
- **LadyofHats.,** (2008). Réparation par excision de bases [Image]. Wikimedia Commons.https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dna_repair_base_excersion_e_n.svg
- **LeCuyer B.E., Criss A.K., and Seifert H.S.,** (2010). Genetic Characterization of the Nucleotide Excision Repair System of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 192, 665–673.
- **Li G.M.,** (1999). The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncology Research*, 11(9), 393-400.
- **Li G.M.,** (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85-98.
- **Liazid A.,** (2012). Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentates au niveau du C.H.U de Tlemcen. Thèse de magistère, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 95 p
- **Lieber M.R.,** (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 181-211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- **Limited A., (n.d.),** Formes de bactéries, illustration. Alamy Images. Retrieved from <https://www.alamyimages.fr/formes-de-bacteries-illustration-image353173698.html?imageid=C897A720-FF3F-46EE-B249-0D09E81DAC6B&p=52089>
- **Madigan M.T, Martinko J.M, Bender K.S, Buckley D.H, Stahl D.A.,** (2018), *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Edition. Pearson, 1064p
- **Maugeri A., Barchitta M., Blanco I., Agodi A., Basile G., & Branca G.,** (2019). Nucleoside analogs : Different ways to inhibit viral replication. *Chemical Society Reviews*, 48(9), 2554-2581. <https://doi.org/10.1039/C8CS00679A>
- **Meguenni N.,** (2016), Caractéristiques phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez des souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires, thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 261p

- **Mezaache S.**, (2012), localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre, Thèse de doctorat, université ABBAS Ferhat Sétif, 221p
- **Miller R., Jeffrey W., Mitchell D., Elasri M.**, (1999). Bacterial responses to ultraviolet light. *Am.Soc.Microbiol.*65, 535–541
- **Monod J.**, (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1), 371-394.
- **Moriarty T. F.**, (2017), Poulsson, A. H., Rochford, E. T. J., & Richards, R. G. Bacterial adhesion and biomaterial surfaces. Dans Elsevier eBooks (pp. 101-129). Récupéré de <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100691-7.00106-3>
- **Mort M., et al.**, (2008). A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Human Mutation*, 29(8), 1037–1047.
- **Murnane J.P.**, (2012). Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat Res*, 730(1–2), 28–36.
- **Nagel Z.D., & Klinman J.P.**, (2017). A 3D-QSAR study on DNA intercalating agents. *PLoS ONE*, 12(7), e0180980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180980>
- **Nakamura T.M.**, (2019). Transposable elements. In Reference Module in Life Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21483-4>
- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., & Killington R.**, (2000). L'essentiel en microbiologie. Port Royal livres. BERTI Editions, 113-121.
- **Nouri A.**, (2011), the discovery of bacteria, AAAS community, <https://www.aaas.org/discovery-bacteria?fbclid=IwAR39I2hzog>
- **Ohlsson T., Bengtsson N.**, (2010). Technologies de transformation minimales dans l'industrie alimentaire. Édition Woodhead dans Food Science and Technology, n.72, 288p.
- **Pantel A.**, (2015), Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez Escherichia coli ST131, thèse de doctorat, université de Montpellier, 244p
- **Peltomaki P.**, (2003). Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(6), 1174-1179.
- **Peltomaki P.**, (2005). Lynch syndrome genes. *Familial Cancer*, 4(3), 227-232.

Références bibliographiques

- **Picard M.**, (2023), Cellule - La division », Encyclopædia Universalis [en ligne], URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/cellule-la-division/?fbclid=IwAR3912hzog>
- **Pourquier P., & Robert J.**, (2011). Présentation générale des mécanismes de réparation de l'ADN. *Bulletin du Cancer*, 98(3), 229-237. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1323>
- **Pray L.**, (2008) Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education* 1(1):100
- **Prescott L.M., Harley J.P., & Klein D.A.**, (2017). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- **Prescott P., Harley L.M., & Klein D.A.**, (2005). *Microbiologie* (6e éd.). Dubuque, IA, Enseignement supérieur, McGraw-Hill.
- **Rao S.**, (2006) -bacterial genetique, dept. of microbiology jjmmc, davangere
- **Robertson A.B., Klungland A., Rognes T., & Leiros I.**, (2009). Base excision repair : the long and short of it. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(6), 981-993. Doi : 10.1007/s00018-009-8736-z
- **Rosset P., Rosset R.**, (1996). Les ultraviolets germicides : Utilisation en industries agro- alimentaires. *Actualités scientifiques et techniques en L.A.A.*, n.48, 12p.
- **San Filippo J., Sung P., & Klein H.**, (2008). Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 229-257. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>
- **Sarasin A.**, (1994), Les gènes humains de la réparation de l'ADN, *Med Sci (Paris)*, Vol. 10, N° 1 ; p.43-54
- **Schaaper R.M., Dunn R.L., and Glickman B.W.**, (1987). Mechanisms of ultraviolet-induced mutation: mutational spectra in *Escherichia coli* lacI gene for wild-type excision-repair-deficient strain. *Journal of Molecular Biology*. 195:187-202.
- **Schleifer K.H., & Stackebrandt E.**, (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 143-187.
- **Setlow R.B.**, (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer : a theoretical analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 3363–3366.


- **Sikora A., Wrzeński M., Rzesutek I., Dziadek J., & Brzezińska M.S.,** (2020). Factors affecting bacterial mutagenesis : A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 108321. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108321>
- **Simonson C.S., Ta K., & Miller R.J.,** (1990). Inducible UV repair potential of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of General Microbiology*, 136(7), 1241-1249. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-7-1241>
- **Solbi S.,** (2013), effet de repiquage de *pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques biochimiques et sensibilité aux antibiotiques, thèse de doctorat, université Mohammed v – Soussi, Maroc, 116p
- **Stillman B.,** (2015) DNA Polymerases at the Replication Fork in Eukaryotes. *Mol Cell.*; 58(4): 602-14.
- **Stover CK, et al.,** (2000), Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799): 959-964.
- **Techno-Science.net., (S.d.),** Bacteria - Histoire. Récupéré de <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Bacteria-page-2.html>
- **Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., & Swings J.,** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.
- **Washburn B.K., & Kushner S.R.,** (1991). Construction and analysis of deletions in the structural gene (*uvrD*) for DNA helicase II of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 2569–2575.
- **Watson J., Crick F.,** (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids : A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737–738.
- **Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.L., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., & Trüper H.G.,** (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 463-464.
- **Witkin E.M.,** (1976), Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40 869-907.
- **Yétérian E.,** (2010), Base moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la Pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*, Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 178p

Références bibliographiques

- **Zelle M.R., & Hollaender A.**, (1955). Radiation on bacteria (pp. 365-430). In A. Hollaender (Ed.), Radiation biology, vol. 2. Ultraviolet and related radiations. McGraw-Hill Book Co., New York.
- **Zhang L.**, (2014). Vers la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN chez Streptomyces : Identification d'acteurs de la recombinaison (Thèse de doctorat, Université de Lorraine).8-15

Les annexes

Annexe 1



V3 - 25/05/11

Milieu gélosé H avec crystal violet
(gélose MacConkey avec crystal violet)
Milieu MacConkey gélosé avec crystal violet (XVII)

356-3617
356-9084

DOMAINE D'APPLICATION

Milieu utilisé pour isoler et dénombrer les coliformes et particulièrement *Escherichia coli* lors du contrôle Pharmacopée de la contamination microbienne des produits non obligatoirement stériles (2.6.13.).

Equivalent USP 30/NF 25 : Milieu XVII

REFERENCE(S)

MICROBIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

• Pharmacopée Européenne 6.0 - Méthodes Biologiques - 2.6.13. : Contrôle Microbiologique des produits non stériles (Recherche de micro-organismes spécifiés)

• USP 30/NF 25 U.S. Pharmacopeia and National Formulary (2007) : Microbial Limit Tests (61) - Microbiological Tests

PRINCIPE

Le principe du milieu repose sur l'aptitude des coliformes à fermenter le lactose (colonies rouge brique).
Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des bactéries Gram positives par les sels biliaires et le crystal violet.

PRESENTATION

- Prêt à l'emploi
20 boîtes x 90 mm **code 356-3617**
- Déshydraté
500 g **code 356-9084**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Prêt à l'emploi : à +2-20°C.
- Déshydraté : +15-25°C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Peptones bactériologiques	20 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Lactose	10 g
Rouge neutre	30 mg
Crystal violet	1 mg
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH (25 °C) final = 7,1 ± 0,2

NB : Des adaptations de la formule ont pu être réalisées afin d'atteindre les critères de performance requis.

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- Diluant(s)
- Eau distillée

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

(liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Plaque chauffante
- Agitateur-homogénéisateur
- Flacons de 125 ml en Pyrex avec bouchons autoclavables
- Boîtes de Petri stériles (Ø = 90 mm)
- Pipettes stériles (1 ml,....)
- Bain-marie avec une précision de ±1°C
- Etuve ou enceinte thermostatée avec une précision de ±1°C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Toujours agiter avant chaque utilisation.

Dissoudre 51,5 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée.

Faire bouillir jusqu'à dissolution complète.

Répartir à raison de 100 ml par flacon et stériliser à l'autoclave 121°C ± 1°C pendant 15 minutes.

Ramener à 44-47°C puis couler en boîtes de Petri. Après solidification, laisser sécher à l'étuve à 37°C ± 1°C (couverture entrouverte).

**Taux de reconstitution : 51,5 g/l
500 grammes de poudre permettent de réaliser 9,7 litres de milieu.**

PROTOCOLE

Ensemencement et incubation

Après recherche présomptive, effectuer une subculture sur milieu de Mac Conkey. Incuber à 44°C ± 1°C pendant 18 à 24 heures.

LECTURE ET INTERPRETATION

- Colonies "lactose négatives" : incolores
- Colonies "lactose positives" : rouge brique, entourées parfois d'un halo opaque de sels biliaires précipités

1/2

Milieu gélosé H avec crystal violet
(géluse MacConkey avec crystal violet)
Milieu MacConkey gélosé avec crystal violet (XVII)

V3 – 25/05/11

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la solution-mère (ou de la dilution 10^{-1} dans le cas d'un produit solide) et le moment où les dilutions entrent en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 15 minutes.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

CONTROLE QUALITE

Au regard des travaux préalables à l'harmonisation des pharmacopées actuellement en cours, nous vous recommandons de vous reporter aux certificats de contrôle pour connaître les modalités mise en œuvre pour le contrôle de la qualité (performance et sélectivité) des milieux de culture fabriqués par Bio-Rad.

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

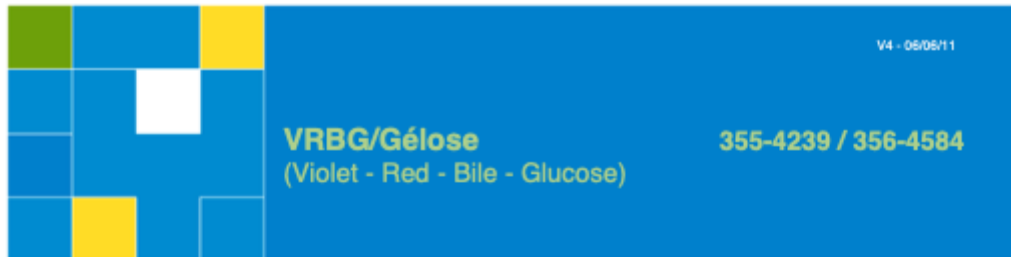
La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

MOTS CLES

Mac Conkey avec Crystal Violet/Coliformes/
Escherichia coli/Produits alimentaires/
isolement/Dénombrement/Lactose/Milieu

2/2

Annexe 2



DOMAINE D'APPLICATION

Milieu utilisé pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries dans les produits alimentaires.

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

• **NF V 08-054 (Février 1999)** : Microbiologie des aliments – Dénombrement des Entérobactéries par comptage des colonies à 30 °C - Méthode de routine (IC : V 08-054).

• **NF ISO 21528-1 (Décembre 2004)** : Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* - Partie 1 : Recherche et dénombrement à l'aide de la technique NPP avec pré-enrichissement.

• **NF ISO 21528-2 (Décembre 2004)** : Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* - Partie 2 : Méthode par comptage des colonies.

PRINCIPE

Le principe du milieu repose sur l'aptitude des *Enterobacteriaceae* à fermenter le glucose. Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des bactéries Gram positives et de certaines bactéries Gram négatives par la présence simultanée du cristal violet et des sels biliaires. Le rouge neutre est un indicateur de pH.

PRESENTATION

- **Prêt à l'emploi**
100 ml x 6 flacons **code 355-4239**
- **Déshydraté**
500 g **code 356-4584**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Prêt à l'emploi : + 2 - 8 °C.
- Déshydraté : + 15 - 25 °C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec.
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Peptone	7 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Sels biliaires	1,5 g
Glucose	10 g
Rouge neutre	30 mg
Cristal violet	2 mg
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C) final = 7,4 ± 0,2	

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- Eau distillée

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI (liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Plaque chauffante
- Agitateur-homogénéisateur
- Flacons de 125 ml en Pyrex
- Boîtes de Pétri stériles (Ø = 90 mm)
- Pipettes stériles (1 ml,...)
- Bain-marie avec une précision de ± 1 °C
- Etuve ou enceinte thermostatée avec une précision de ± 1 °C
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Toujours agiter avant chaque utilisation
Mettre 38 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée, préalablement portée à 100 °C pendant 10 minutes, puis ramenée à la température du laboratoire. Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.
Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à complète dissolution. Répartir ce milieu peut être utilisé dès sa préparation.
Ne pas autoclaver.
Conserver le flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec.

Taux de reconstitution : 38 g/l.
500 grammes de poudre permettent de réaliser 13,15 litres de milieu.

VRBG/Gélose
(Violet - Red - Bile - Glucose)

VS – 06/06/11

PROTOCOLE

• **Préparation des échantillons**

A effectuer conformément à la norme du produit concerné.

• **Ensemencement et incubation**

- Inoculer 1 ml du produit à analyser ou de ses dilutions décimales dans des boîtes de Petri stériles.
- Couler environ 15 ml de milieu fondu, refroidi à 44 - 47 °C, homogénéiser et laisser solidifier.
- Couler une seconde couche (environ 2 mm d'épaisseur) de ce milieu maintenu à 44 - 47 °C et laisser refroidir à nouveau.
- Incuber à (30 °C, 35 °C ou 37 °C) ± 1 °C pendant 24 h ± 2 heures.

LECTURE ET INTERPRETATION

Après 24 heures d'incubation, dénombrer les colonies typiques *Enterobacteriaceae* sur des boîtes comprenant entre 15 et 150 colonies. Les *Enterobacteriaceae* forment des colonies roses-rouge (Glucose +) ayant un diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm avec ou sans zone de précipitation de la bile.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la solution mère (ou de la dilution 10⁻¹ dans le cas d'un produit solide) et le moment où les dilutions entrent en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 15 minutes.
- Ne pas autoclaver
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

PERFORMANCES/CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturales sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

MICRO-ORGANISME	Culture des micro-organismes en 24H à 37 °C		
	Fermentation du glucose	Diamètre	PR*
Productivité			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Positive. Colonies roses à rouges avec ou sans halo de précipitation.	≥ 0,5 mm	≥ 0,5
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	Positive. Colonies roses à rouges avec ou sans halo de précipitation.	≥ 0,5 mm	≥ 0,5
Sélectivité			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	Pas de croissance		

*PR = Nombre total de colonies obtenu sur 2 boîtes de milieu V.R.B.G./ Nombre total de colonies obtenu sur 2 boîtes de milieu T.C.S. gélose

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

MOTS CLES

V.R.B.G. / *Enterobacteriaceae* / Produits alimentaires / Recherche / Dénombrement / Cristal Violet / Sels biliaires / Glucose / Fermentation / NPP / Milieu.

BIBLIOGRAPHIE

• **MOSSEL D.A.A., MENDERINK W.H.J. and SCHOLTS H.H. (1962):** Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of all *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology* 84: 381.

2/2



Annexe 3

KING B

55278

MILIEU DE DIFFÉRENCIATION DES PSEUDOMONAS



1- APPLICATION

Le milieu de King B permet la détection de la synthèse de pyoverdine, pigment élaboré par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas*. Utilisé en parallèle avec le milieu de King A (détection de la pyocyanine), Il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

2- PRINCIPE

La présence de sulfate de magnésium fournit les cations nécessaires à l'activation de la pyoverdine qui se manifeste en colorant le milieu de culture en vert-jaune fluorescent. La présence de phosphate permet d'inhiber la production de pyocyanine, pigment spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*.

3- PRÉSENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
25 tubes de 7 ml code 55278

4- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

La gélose King B est préparée selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney (1).

Peptone	20
Agar purifié	12
K ₂ HPO ₄ (anhydre)	1,5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (anhydre)	1,5

5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : à + 2 - 8°C.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6- UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu King B

Ensemencement :

Ensemencer en faisant une strie médiane à la surface de la gélose avec une ôse de culture pure et fraîche prise dans un bouillon ou sur un milieu gélosé. Replacer la capsule sans la revisser.

Incubation :

Incuber pendant 24 à 48 heures à 30°C. Au-delà, l'incubation à l'étuve est inutile, mais il est possible de conserver les cultures à température ambiante (18-30°C).

Lecture - Interprétation :

Une synthèse de pyoverdine se traduit par une coloration **verte fluorescente**.

7- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITE DU TEST

- Aspect du milieu prêt à l'emploi : gélose limpide **ambrée**.
- Les performances culturales du milieu King B sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	PIGMENTATION EN 24 - 48H À 30°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Jaune-verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Jaune-verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17934	Jaune-verte
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13	Jaune-verte faible

8- CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptations. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

9- LIMITES D'UTILISATION

- Certaines souches de *P. fluorescens* ou de *P. putida* (provenant en général de l'eau ou du sol) n'élaborent que lentement la pyoverdine. Il faut alors incuber le milieu à 20°C pendant 2 à 3 semaines. Certaines de ces souches peuvent être apigmentées.
- Du fait de leurs exigences nutritionnelles, certains micro-organismes peuvent ne pas se développer sur ce milieu.
- Il est indispensable de procéder à partir de cultures pures et fraîches pour que les résultats puissent être interprétés.
- Il est recommandé de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée.

10- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KING E.O., WARD M. et RANEY D.E.J., J. Lab. Clin. Méd., 1954, 44, p. 301.

Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel.: +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax: +33 (0) 1 47 41 91 33



08/2009

Annexe 4

KING A

55274

MILIEU DE DIFFÉRENCIATION DES PSEUDOMONAS



1- APPLICATION

Le milieu de King A permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie pyocyanique). Utilisé en parallèle avec le milieu de King B (détection de la pyoverdine), il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

2- PRINCIPE

La production de pyocyanine se manifeste en colorant le milieu de culture en **bleu**. Si les deux pigments – pyocyanine et pyoverdine – sont synthétisés en même temps, le milieu se colore en vert.

3- PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi : code 55274
25 tubes de 7 ml

4- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Le milieu King A est préparé selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney (1).

Peptone	20
Agar purifié	12
K ₂ SO ₄ (anhydre)	10
MgCl ₂ (anhydre)	1,4

5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : à +2 - 8°C.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6- UTILISATION

- Matériel :**
- Matériel fourni : milieu King A

Ensemencement :

Ensemencer en faisant une strie médiane à la surface de la gélose avec une ôse de culture pure et fraîche prise dans un bouillon ou sur un milieu gélosé. Replacer la capsule sans la revisser.

Incubation :

Incuber pendant 24 à 48 heures à 30°C. Au-delà, l'incubation à l'étuve est inutile, mais il est possible de conserver les cultures à température ambiante (18-30°C).

Lecture :

Une synthèse de pyocyanine se traduit par une coloration **bleue**. Une synthèse de pyoverdine et de pyocyanine associée provoque une coloration verte. En cas de doute, il suffit de verser 0,5 ml de chloroforme et de le laisser pendant quelques minutes au contact de la gélose en position inclinée : la pyocyanine, très soluble dans le chloroforme, colore celui-ci en **bleu** (virage au rouge en ajoutant quelques gouttes d'un acide fort). Le milieu n'a pas besoin d'être examiné au-delà du 4^e jour de culture.

7- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITE DU TEST

- Aspect du milieu prêt à l'emploi : gélose limpide **ambrée**.
- Les performances culturales du milieu King A sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	PIGMENTATION EN 24 - 48 H À 30°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bleue - verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Bleue - verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17934	Bleue - verte
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13	Incolore

8- CONTRÔLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

9- LIMITES D'UTILISATION

- La formation de colonies non pigmentées ne peut pas totalement éliminer la possibilité d'un *Pseudomonas aeruginosa*.
- Il est indispensable de procéder à partir de cultures pures et fraîches pour que les résultats puissent être interprétés.
- Il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce précise.
- Du fait de leurs exigences nutritionnelles, certains micro-organismes peuvent ne pas se développer sur ce milieu.

10- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1.KING E.O., WARD M. et RANEY D.E.J., J. Lab. Clin. Méd., 1954, 44, p. 301.

Bio-Rad
3, boulevard Raymond Polanco
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel : +33 (0) 1 47 25 60 00
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33



0312009



Annexe 5

BIO-RAD

NUTRITIVE BROTH 1,3% + NaCl

53446

64065

BOUILLON / MILIEU D'ENRICHISSEMENT NON SÉLECTIF

IVD

1- APPLICATION

Le bouillon Nutritive Broth 1,3% + NaCl est un milieu liquide qui permet la croissance des bactéries ne présentant pas d'exigences particulières.

2- PRINCIPE

La culture des bactéries non exigeantes est favorisée par les substances nutritives apportées par la peptone, l'extrait de viande et l'extrait de levure. La présence de chlorure de sodium permet d'éviter l'hémolyse, lorsqu'on y ajoute du sang.

Il est possible d'ajouter différents ingrédients : sucres, colorants, sérum, sang, extrait globulaire, etc...

Il est possible de l'utiliser pour la recherche de la sensibilité aux antibiotiques de bactéries peu exigeantes, par la méthode de dilutions en tubes.

3- PRÉSENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - 25 tubes de 9 ml code 53446
- Milieu déshydraté
 - flacon de 500 g code 64065

4- COMPOSITION (en g/l d'eau distillée)

Peptone	3,7
Extrait de viande	5
Extrait de levure	1,2
Chlorure de sodium	3,1
pH final	7,4 +/- 0,2

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre **13 grammes** de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Répartir en tubes ou en flacons.

5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : à + 2-8°C
- Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec à + 15-25°C.
La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6- UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu Nutritive Broth 1,3% + NaCl.

Ensemencement :

Ensemencer directement à partir d'un prélèvement à étudier, ou à partir d'une culture pure et fraîche de la souche à étudier prélevée sur milieu gélosé. Pour la conservation des échantillons biologiques, se référer aux recommandations en vigueur [1].

Incubation :

Incuber pendant 24 heures à 37°C.

Lecture :

Observer un trouble témoin de la croissance des bactéries.

7- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITÉ DU TEST

- Aspect du milieu prêt à l'emploi : bouillon limpide **jaune clair**.
- Aspect du milieu déshydraté : poudre **beige**.
- Les performances culturales du nutritive broth 1,3% + NaCl sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	RÉSULTAT DE LA CULTURE EN 24 H à 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Bonne croissance
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Bonne croissance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bonne croissance

8- CONTRÔLE QUALITÉ DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

9- LIMITES D'UTILISATION

- Du fait de leurs exigences nutritionnelles, certains micro-organismes peuvent ne pas se développer sur ce milieu.
- Le bouillon nutritif, de composition très simple, est généralement utilisé pour la subculture de colonies préalablement isolées sur un milieu riche, mais il ne convient pas pour la culture des bactéries exigeantes.
- Il est indispensable de procéder à partir de cultures pures et fraîches pour que les résultats puissent être interprétés.
- Il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée.

10-RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Basic Laboratory Procedures Clinical Bacteriology. World Health Organization. Geneva. 1991. 1^{re} édition.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Nanterre-Courcouronnes France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33



01/2006
code: 18088 -A4

Annexe 6

L'appareil d'UV.

