



**République Algérienne Démocratique et Populaire**



**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La recherche**

**Scientifique Université Abbès Laghrouour – Khenchela**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département De Biologie Moléculaire et cellulaire**

**Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de**

**Master académique en Biologie**

**Option : Génétique**

**Thème**

**Application des outils de la biologie  
moléculaire dans la bactériologie  
médicale**

**Présenté par : RAHABI Chaima & RAHALI Ilhem**

**Devant le jury**

- |                  |                 |                        |
|------------------|-----------------|------------------------|
| * Président:     | Dr. BOUAZZA L.  | MCB. Univ. Khenchela   |
| * Examinatrice : | Dr. SBIHI F.Z.  | MCB. Univ. Khenchela   |
| * Promotrice:    | Dr. KHEDDOUMAA. | MCB. Univ. Khenchela   |
| * Co-Promoteur:  | Dr. RAHAB H.    | MRB. CRBT. Constantine |

**2019\_2020**

## Remerciement

*Avant tout, Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour mener à terme notre formation de Master et pouvoir réaliser ce travail de recherche.*

*Nous Remercions les Membres de Jury :*

*Dr. BOUAZZA Lyas (maître de conférences classe B) à l'université de Khenchela, qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Dr. SBIHI Fatma Zohra (Maître de conférences classe B) à l'université de Khenchela, d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds Remerciements à notre promotrice Dr. KHEDDOUMA ASMA (Maître de conférences classe B) à l'université de Khenchela, qui nous a guidé, de ses précieux conseils et suggestions, et la confiance qu'elle nous a données tout au long de ce travail. C'était un honneur pour nous de travailler avec une enseignante aussi émérite.*

*Nous adressons notre gratitude et nos sincères remerciements à notre Co-Promoteur Dr. RAHAB Hamza (maître de recherche classe B) au CRBT, Constantine ; pour son aide et surtout d'avoir veillé à l'aboutissement de notre projet.*

## Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A mes **chers parents** qui m'ont toujours encouragé à travailler encore plus et qui ont toujours cru en moi, vos paroles demeurent toujours dans mon cœur, je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour me voir réussir.

Aux docteurs de la spécialité Génétique de l'université de Khenchela plus précisément Monsieur **Bouaaza**, Madame **Bendjemana** et Monsieur **Hamada**.

A mon frère **Hamada** pour son soutien moral et psychologique ainsi que son encouragement durant la rédaction de ce manuscrit. Je sais que tu as toujours été fier de moi et il faut croire que c'est réciproque.

A **mes sœurs** qui m'ont soutenu moralement et psychologiquement durant toute ma vie et continuent à le faire, je vous adore.

A ma tante **Nafissa** ; vous êtes une femme exceptionnelle, ton amour envers moi est unique, vous étiez présente à mes côtés lorsque j'étais encore en bas âge et vous continuez toujours à l'être comme une véritable mère.

Je dédie ce modeste travail :

À mes **chers parents**, sans leurs soutiens et leurs encouragements, je n'aurai jamais pu accomplir ce travail.

À toute **ma famille**, particulièrement mes **chers sœurs** et **frères** pour leur support continu et leur amour.

À tout mes amis et proches : **Rayan ,Wissam et Zahra....**

À tous mes collègues et tous mes camarades (étudiants de la spécialité génétique promotion 2020) pour tous les bons moments que nous avons partagés.

*ILHEM*

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre I. Généralité sur la bactériologie</b> .....	3
I. Les microorganismes.....	3
I.1. Les bactéries pathogènes .....	3
I.2. Les bactéries utiles .....	4
II. La croissance bactérienne.....	5
II.1. Cinétique de la croissance bactérienne .....	5
II.2. Les conditions de la croissance bactérienne .....	6
III. Différents formes de la cellule bactérienne .....	8
IV. L'antibiogramme.....	9
<b>Chapitre II. Anatomie fonctionnelle des bactéries</b> .....	10
I. Généralité.....	10
II. L'appareil nucléaire bactérien.....	11
III. Le cytoplasme bactérien.....	12
IV. Les ribosomes .....	12
V. La membrane cytoplasmique .....	13
VI. La paroi bactérienne.....	14
VII. Les constituantes inconstantes.....	16
VII.1. La capsule .....	16
VII.2. Les <i>pili</i> .....	17
VII.3. Les flagelles.....	17
<b>Chapitre III. Génétique bactérienne</b> .....	19
I. La mutation .....	19
II. Les variations génétiques par transfert de matériel génétique.....	19
II.1. La transformation .....	19
II.2. La conjugaison .....	20
II.3. La transduction .....	22

<b>Chapitre IV. Caractérisation moléculaire des microorganismes</b> .....	23
I. Technique d'amplification ou Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	23
I.1. Les acteurs de la PCR.....	23
I.1.1. L'ADN à amplifier .....	23
I.1.2. Les deux amorces .....	23
I.1.3. La taq polymérase enzyme thermorésistante .....	23
I.1.4. Le tampon et les ions (MgCl <sub>2</sub> ).....	24
I.1.5. Le thermocycleur.....	24
I.1.6. Le milieu réactionnel.....	24
I.2. Les cycles de PCR.....	24
I.2.1. Dénaturation .....	24
I.2.2. Hybridation .....	25
I.2.3. Elongation .....	25
I.3. Variantes associées à la PCR.....	26
I.3.1. PCR quantitative ou PCR en temps réel.....	26
I.3.2. La RT-PCR : .....	26
I.4. Application de la PCR.....	26
II. Technique de gel électrophorèse en conditions dénaturantes (DGGE) .....	27
II.1. Principe de la DGGE.....	27
III. Le clonage moléculaire .....	28
IV. Le séquençage.....	30
<b>Conclusion</b> .....	32
<b>Références bibliographiques</b> .....	33

<b>Figure 1.</b> Forme de quelques cellules bactériennes.....	8
<b>Figure 2.</b> La morphologie d'une cellule bactérienne.....	10
<b>Figure 3.</b> La structure de la membrane cytoplasmique.....	14
<b>Figure 4.</b> La structure de peptidoglycane .....	15
<b>Figure 5.</b> Les composants de la cellule bactérienne.....	16
<b>Figure 6.</b> L'ultra structure d'un flagelle de bactéries à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droit).....	18
<b>Figure 7.</b> Les étapes de la conjugaison.....	21
<b>Figure 8.</b> Les cycles de PCR.....	25
<b>Figure 9.</b> Processus de clonage moléculaire.....	29

ADN : acide desoxyribonucleotide.

ARN : acide ribonucléique.

D-Glu : acide D-glutamique.

D-Ala : la D-alaline.

DAP : acide méso-diaminopimélique.

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.

DNTP : désoxynucleotide triphosphate.

Mg : Magnésium.

NGS : séquençage à haut débit.

NaCl : Chlorure de sodium.

NAG: N-acétylglucosamine.

NAM :N-acétylmuramique.

PLP : protéines de liaison aux pénicillines.

PBP :penicillin-binding-proteins.

PCR : polymérase chain reaction.

RT-PCR : Reverse transcription ou transcription inverse.

Taq: *Thermus aquaticus*.

Tm : température de fusion moléculaire.

UV : ultraviolet.

Ce travail avait pour objectif d'écrire les principaux outils de biologie moléculaire et leur application en bactériologie médicale. Dans l'impossibilité de réaliser la partie pratique de ce travail, on s'est limité à une partie théorique qui s'articule sur quatre chapitres : le premier chapitre comporte des généralités sur le monde bactérien. Le deuxième chapitre est consacré à la présentation de l'anatomie fonctionnelle des bactéries. Le troisième chapitre parle de la génétique bactérienne plus précisément les mutations et les variations génétiques par transfert de matériel génétique. Et le dernier chapitre décrit les outils de biologie moléculaire et leurs applications.

**Mots clés:** Outils de biologie moléculaire, bactériologie médicale, le monde bactérien.

This work aimed to write the main molecular biology tools and their application in medical bacteriology. Since it is impossible to do the practical part of this work, we limit ourselves to the theoretical part, which consists of four chapters: Chapter one contains generalities about the world of bacteria, The second chapter is dedicated to presenting the functional anatomy of bacteria. Chapter Three talks about bacterial genes more specifically about mutations and genetic changes by transfer of genetic material. The final chapter describes the tools and applications of molecular biology.

**Keywords:** Molecular biology tools, medical bacteriology, the world of bacteria.

يهدف هذا العمل إلى عرض أدوات البيولوجيا الجزيئية الرئيسية وتطبيقاتها في علم الجراثيم الطبي. نظرًا لاستحالة القيام بالجزء التطبيقي من هذا العمل، فإننا نقتصر على الجزء النظري الذي يتكون من أربعة فصول: يحتوي الفصل الأول على عموميات عن عالم البكتيريا. الفصل الثاني مكرس لعرض التركيب البنيوي الوظيفي للبكتيريا. يتناول الفصل الثالث الجينات البكتيرية. يصف الفصل الأخير أدوات البيولوجيا الجزيئية وتطبيقاته. **الكلمات الدالة:** أدوات البيولوجيا الجزيئية، علم البكتيريا الطبي، عموميات عن عالم البكتيريا.

La bactériologie médicale, est une branche de la biologie médicale qui consiste en l'analyse de divers liquides biologiques dans le but d'isoler et d'identifier des bactéries pouvant être responsables des maladies. Elle implique l'identification, la classification et la caractérisation des espèces bactérienne. L'abord de la bactériologie médicale est indissociable des études de biologie moléculaire qui permis de décrire et la génétique des bactéries. Ces études ont conduit à mettre au point les procédés d'isolement, d'identification, de typage et la caractérisation des propriétés de virulence, de pathogénicité, de résistance aux agents antimicrobiens (**ABABOU ET AL., 2010**)

L'identification des microorganismes se fait souvent par des méthodes classiques de microbiologie, Ces techniques reposent sur la mise en culture d'un inoculum dans un milieu spécifique de chaque germe. La composition du milieu, la température d'incubation et la nature de l'atmosphère dans laquelle est incubé le milieu permettent de cultiver sélectivement une population bactérienne. Dans le cas des techniques de dénombrement, la prise d'essai subit des dilutions décimales successives et un inoculum de chaque dilution est utilisé pour ensemencher un milieu, liquide ou solide. Après incubation, il est procédé au comptage des colonies d'aspect caractéristique et à une éventuelle confirmation par des tests biochimiques (galeries biochimiques) (**MADOU ET AL., 2018**).

Les techniques classiques de numération microscopique offrent une possibilité de détecter les microorganismes simplement en regardant un échantillon directement sous microscope optique. Bien qu'il soit généralement relativement facile de repérer, avec soin et patience, les microorganismes à l'état frais, il est possible de réaliser des colorations afin de rendre ces microorganismes plus facilement visibles, ainsi les deux colorations couramment employées sont la coloration simple au bleu de méthylène et la coloration complexe (double) de Gram (**ABABOU ET AL., 2010**).

Les méthodes classiques microbiologiques sont définies par un ensemble d'étapes successives, allant du prélèvement de l'échantillon biologique jusqu'à la remise des résultats, Mais ces méthodes se limitent aux bactéries cultivables. Cependant, la biologie moléculaire pourrait rendre possible la détection des microorganismes indétectables par les méthodes microbiologiques et permet aussi leur identification. Les méthodes moléculaires pourraient aussi réduire les risques de contaminations car ici le travail porte sur l'ADN et non directement sur les microorganismes (**MADOU ET AL., 2018**).

Les techniques de biologie moléculaire regroupent un ensemble des techniques de pointes utilisées pour les analyses biologiques d'organismes vivants et la compréhension des mécanismes de la cellule à l'échelle des molécules, Ils sont développés et appliqués en laboratoire, Ces outils offrent un intérêt tout particulier pour les microorganismes car ces derniers sont rarement isolables et cultivable sur des milieux synthétiques. Près de 99% des microorganismes présents dans un échantillon environnemental ne sont généralement pas cultivables et sont donc complètement ignorés lors d'étude utilisant des méthodes de microbiologie classiques basées sur la culture de ces microorganismes sur milieux synthétiques. Les outils de biologie moléculaire vont permettre de passer outre cette limitation puisqu'ils ne nécessitent pas de cultiver et d'isoler les microorganismes pour les étudier. Leur force réside également dans le fait que l'on puisse étudier et analyser lors d'une même étape, l'ensemble des microorganismes présents dans un échantillon (**JEAN ET AL., 2015**).

Il existe de nombreuses techniques de biologies moléculaires, parmi ces techniques ; la technique de PCR et le séquençage, La PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) est une méthode d'amplification génique, qui permet de dupliquer de manière exponentielle une séquence d'ADN ou d'ARN connue à partir d'une faible quantité. Et la techniques de séquençage qui représente un procédé utilisé pour déterminer l'ordre (la séquence) des bases dans les acides nucléiques (ADN et ARN). Le séquençage massif consiste à appliquer ce procédé sur l'ensemble de l'ADN de la totalité d'un échantillon, sans a priori. Le métagénome (ADN total de l'échantillon) ou le métatranscriptome (ARN total de l'échantillon) des organismes présents dans l'environnement d'intérêt sont extraits et fragmentés. Ce mélange de fragments génomiques est par la suite séquencé, c'est-à-dire que la séquence complémentaire d'un brin correspondant à un fragment est amplifiée et le signal d'amplification spécifique de chaque acide nucléique incorporé dans la séquence est lu (**JEAN ET AL., 2015**).

L'objectif principal de cette étude est l'identification les communautés bactériennes par l'application des techniques de la biologie moléculaire.

Ce mémoire est composé de 4 chapitres : le premier comporte des généralités sur le monde bactérien, le deuxième est consacré à la présentation de l'anatomie fonctionnelle des bactéries. Le troisième chapitre parle de la génétique bactérienne plus précisément les mutations et les variations génétiques par transfert de matériel génétique et le dernier chapitre décrit les outils de biologie moléculaire et leurs applications.

### I. Les microorganismes

En 1878, SEDILLOT crée le terme de microbes. Les microorganismes ou microbe sont des êtres vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu. Les microbes peuplent tout notre environnement, ils sont présents dans l'air, l'eau ainsi sur tous les objets qui nous entourent (**Yahiaoui, 2014**).

La microbiologie s'intéresse à l'étude des microorganismes, qu'ils s'agissent des protozoaires, des champignons microscopique, des algues microscopiques et des bactéries. Une connaissance approfondie de leur physiologie, de leur génétique et des interactions entre eux facilite notre compréhension du monde vivant à l'échelle microscopique (**Singleton, 2004**).

Les micro-organismes peuvent être utilisés pour réduire les effets de la pollution (**Hart et Shears, 1997**).

Les micro-organismes sont utilisés pour l'élaboration de multiples produits alimentaires comme la fabrication des produits laitiers (fromages, yaourts), la production de boissons alcoolisées d'arôme et celle du vinaigre (**Hart et Shears, 1997**).

En Microbiologie industrielle, les micro-organismes sont utilisés pour produire de nombreuses biomolécules telles que des antibiotiques, des vaccins, des stéroïdes, des alcools et d'autres solvants, des vitamines (vitamine B12, riboflavine), des acides aminés (lysine, acide glutamique, phénylalanine, acide aspartique) et des enzymes (**Drouet, 2012**).

#### I.1. Les bactéries pathogènes

La diversité des bactéries est très importante dans l'environnement. Certaines sont inoffensives voire bénéfiques. D'autres par contre sont responsables de maladies infectieuses en envahissant un hôte, d'autres libèrent des toxines dans l'aliment ou encore sont responsables de toxi-infections.

(**Singleton, 2004**).

L'ADN plasmidique est, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques (**Singleton. 2004**).

Exemple de bactéries pathogènes (**Singleton, 2004**):

*Bartonella henselae* (responsable de la maladie des griffes du chat).

*Legionella pneumophila* (responsable de la maladie du légionnaire).

*Tropheryma whip-Pelii*. (Responsable de la maladie de Whipple).

*Escherichia coli* (diarrhées, infections urinaires, infections nosocomiales : septicémies, méningite du nouveau-né, syndrome hémolytique-urémique).

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (infection des yeux, des plaies et gastro-entérite aigue).

### I.2. Les bactéries utiles

La diversité des bactéries est très importante dans l'environnement. Certaines sont inoffensives voire bénéfiques. D'autres par contre sont responsables de maladies infectieuses. Une des raisons majeures de l'étude des bactéries est la lutte contre les maladies. Les bactéries sont la cause de quelques maladies grave ainsi de multiple affection bénigne, les bactéries pathogènes ne constituent qu'une petite partie de l'ensemble de la population bactérienne la plupart des bactéries sont inoffensive ne présentent que peu ou pas de danger et beaucoup s'avèrent indéniablement utiles à l'homme; par exemple certaines d'entre elles produisent les antibiotiques d'autres fournissent les enzymes des poudres à lessiver biologique, il y en a qui servent d'insecticides microbiens et protèges les cultures de certains insectes nuisibles. (**Singleton, 2004**)

Quand il s'agit de nourriture, on considère ses bactéries comme un mal ces microbes qui gâtent ou empoisonnent les aliments, mais certaines espèces sont en fait employées pour la production alimentaire. Ainsi, dans la fabrication du beurre, du fromage et du yoghourt, certaines bactéries interviennent pour convertir le lactose du lait en acide lactique. L'industrie alimentaire utilise largement la gamme de xanthane, un produit bactérien, comme agent gélifiant et épaississant. Les bactéries assurent des rôles essentiels dans les cycles géochimiques, elles influencent la fertilité et la structure des sols et une meilleure exploitation de la terre et des cultures (**Singleton, 2004**).

La biodiversité microbienne joue un rôle vital dans les cycles biologiques (cycle du carbone, cycle de l'azote et du soufre), Mieux nous connaissons les bactéries plus efficacement nous pourrions limiter leurs potentialités nocives et tirer avantage de leurs activités utiles.

### II. La croissance bactérienne

Il s'agit d'un accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. La croissance se manifeste par une augmentation numérique des cellules bactériennes et non pas une augmentation de la taille comme chez les organismes supérieurs (l'homme, animal, plante) (**Singleton, 2004**).

Les bactéries sont des organismes asexués dont la reproduction a lieu par division cellulaire ou reproduction binaire encore appelée scissiparité. La reproduction se fait selon trois phases : allongement de la bactérie, duplication des constituants et séparation. La multiplication d'une bactérie, donne naissance par scissiparité à deux nouvelles bactéries identiques (**Guezlane et al., 2008**).

La croissance d'une bactérie placée dans les conditions idéales de culture peut être définie par deux constantes :

- Le temps de génération (G) qui est le temps requis pour un dédoublement du nombre de bactérie. (**Guezlane et al., 2008**), (*Escherichia coli*. Temps de génération=20min).
- Le taux de croissance qui est le nombre de division par unité de temps. Au cours de la croissance, le milieu s'appauvrit en produits du catabolisme, souvent toxiques (**Guezlane et al., 2008**), (le taux de croissance pour *E. coli*=1h).

#### II.1. Cinétique de la croissance bactérienne

L'étude de la croissance bactérienne dans le temps peut être représentée dans un graphique en portant en ordonnée les valeurs du log de la DO de milieu de culture et en abscisse. Le temps (en heure). La courbe de croissance obtenue montre alors 6 étapes ou phases :

**Phase I** : phase de latence : accoutumance des bactéries à leur environnement et synthèse des premières enzymes. Elle dépend de la nature du milieu de culture et de la taille et de la nature de l'inoculum (**guezlane et al., 2008**)

**Phase II** : phase de d'accélération ; augmentation de la vitesse de croissance tend vers son taux maximal.

**Phase III** : phase de croissance exponentielle ; le taux de croissance est constant, il atteint la valeur maximale. Il est influencé par la Température, PH, la nature et la concentration des aliments. La masse cellulaire est représentée par les cellules viables.

**Phase IV** : phase de ralentissement ; épuisement de milieu de culture et accumulation des déchets. « Début d'autolyses ».

**Phase V** : phase stationnaire ; la masse bactérienne maximale : les bactéries vivent sur « leur réserves ». Le taux de croissance devient nul. Sa durée est variable souvent courte en milieu synthétique.

**Phase VI** : phase de déclin ; la masse bactérienne décroît du fait de la lyse des bactéries.

### II.2. Les conditions de la croissance bactérienne

Dans une cellule bactérienne, la croissance conduit à la division de la cellule en deux cellules semblables ou identiques. Ainsi chez les bactéries « croissance et reproduction » sont étroitement liées, et le terme croissance est généralement employé pour désigner les deux processus.

Les bactéries ne croissent que si leur environnement est adéquat. Si le milieu de croissance n'est pas optimal, il peut y avoir croissance à plus faible vitesse ou pas de croissance. C'est selon les espèces et les conditions. Les exigences essentielles pour la croissance bactérienne comprennent : les substances nutritives, une source d'énergie, l'eau, une température appropriée, un PH optimal, une teneur appropriée en oxygène. Ses facteurs d'agissent ensemble, la modification de l'un d'entre eux peut renforcer ou réduire les effets d'un autre (**Klug et al., 2006**).

Les substances nutritives : les substances nutritives servent de matières premières aux cellules pour leur croissance. Les bactéries utilisent pour se nourrir une vaste gamme de composés, ceux-ci incluent les sucres, les hydrates de carbone, les acides aminés, les stérols, les alcools, les hydrocarbures, les sels inorganiques et les dioxydes de carbone (**Klug et al., 2006**).

L'énergie : Beaucoup des réactions chimiques essentielles qui se déroulent dans une cellule vivante consomment de l'énergie. Elle est nécessaire pour la mobilité flagellaire et pour l'absorption de diverses substances nutritives, cette énergie provient de milieu dans lequel la bactérie vive. Par exemple : les espèces photosynthétiques (Cyanobactérie) tirent leur énergie principalement de la lumière **(Singleton, 2004)**.

L'eau : l'eau contribue dans une forte proportion à la masse d'une bactérie et, au cours de la croissance, les substances nutritives et les déchets pénètrent et quittent respectivement la cellule. Les différents espèces bactériennes tolèrent, à divers degrés un fort déficit en eau, beaucoup d'espèces ne peuvent survivre longtemps à l'état desséchés.

La température : Les bactéries peuvent se croître plus rapidement à une certaine température appelée : la température optimale de croissance. La vitesse de croissance se réduit lorsque la température s'écarte de cet optimum. Pour toutes les bactéries, il y a une température maximum et une température minimum au delà desquelles la croissance s'arrête **(Singleton, 2004)**.

Le pH : le pH optimum pour la croissance de la plupart des bactéries se situe aux environs de 7 (pH neutre), et la majorité des espèces ne peuvent se développer dans des milieux très acides ou très alcalins on peut citer comme exemple :

*Thiobacillus thiooxidans* (pH optimum 2 à 4).

*Thermomicrobium roseum* (pH optimum 8.2 à 8.5).

L'oxygène : certaines bactéries ont besoin d'oxygène pour croître, d'autres ne se développent qu'en absence d'oxygène, d'autres encore peuvent croître que se gaz soit présent ou non **(Singleton, 2004)**. Les bactéries qui ont besoin d'oxygène pour sa croissance sont dites : aérobies strictes ou obligatoires. Les bactéries qui peuvent croître qu'en absence d'oxygène sont appelées anaérobies strictes et les bactéries qui croissent normalement en présence d'oxygène mais peuvent comme même se développer en absence d'oxygène s'appellent les anaérobies facultatifs. De la même façon celles qui croissent en anaérobiose mais elles peuvent se développer en présence d'oxygène sont des aérobies facultatifs.



### IV. L'antibiogramme

C'est la méthode la mieux standardisée, utilisée en routine et d'un coût raisonnable mais qui est peu discriminante pour la détermination de la sensibilité d'une bactérie aux antibiotique par examen de laboratoire de bactériologie indispensable dans bien des cas **(Corne, 2004)**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible des bactéries permet d'évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Cette concentration est déterminée par une méthode standardisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Un inoculum bactérien est exposé à une gamme de concentrations d'antibiotique obtenue par une série de dilutions au demi. La croissance des bactéries est observée à l'œil nu après 15 à 18 heures d'exposition à l'antibiotique à 35°C. La CMI est alors la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. La mesure de la CMI permet de déterminer si une souche est sensible ou résistante à l'antibiotique testé. Pour chaque antibiotique, on a pu mesurer les concentrations sériques obtenues chez le patient (humain) dans le cadre d'une posologie normale. on distingue alors :

La souche est dite résistante : la CMI ne peut être atteinte par un traitement réalisé à l'aide de cet antibiotique sans être toxique.

La souche est dite sensible : la CMI peut être atteinte par un traitement usuel réalisé à l'aide de cet antibiotique.

La souche est dite intermédiaire : la CMI ne peut être atteinte qu'en augmentant les doses **(Me-hamidia, 2014)**.

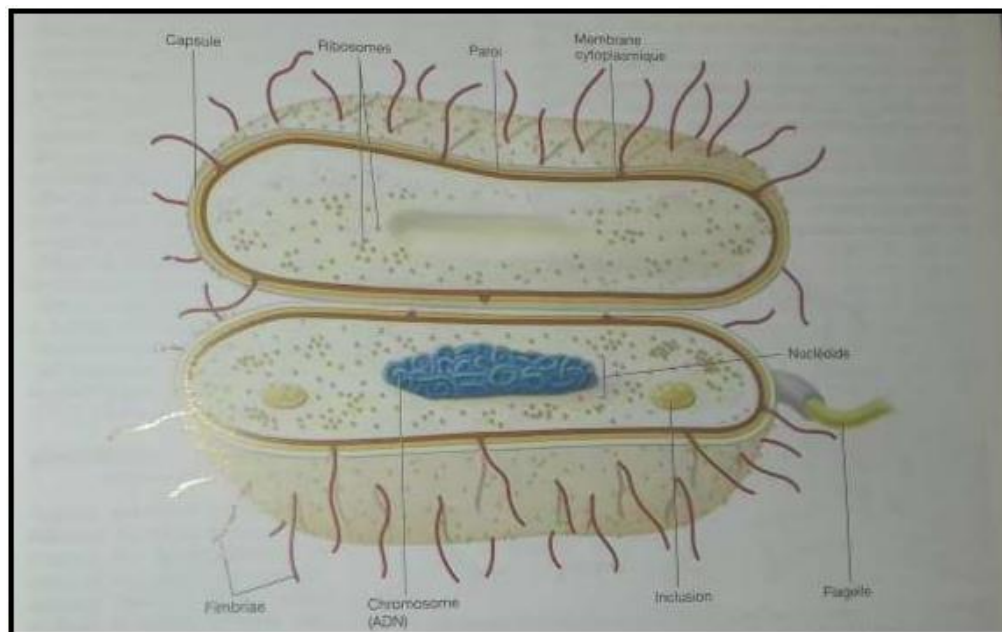
## Chapitre II. Anatomie fonctionnelle des bactéries

### I. Généralité

Les bactéries apparues sur terre il y a quelque 3.5 milliards d'années, elles ont façonné notre planète en modifiant son atmosphère et sa surface, permettant à d'autres formes de vie de se développer. Le monde bactérien, c'est une diversité infinie de formes et de couleurs. En bâtonnets ou arrondies, spiralées ou de structure non définies, les bactéries peuvent produire différents pigments leur conférant une grande variété de couleurs **(Perron et al., 2010)**.

Les bactéries sont des êtres vivants unicellulaires procaryotes, leur taille varie de 1 à 10 microns ( $\mu\text{m}$ ). Les bactéries les plus petites ont une taille d'environ 0.2 micromètre (chlamydia) et les plus longues peuvent atteindre 250 micromètre de long (Bactérie géante). On trouve les bactéries dans tous les types d'environnement présents dans la nature : elles colonisent tous les écosystèmes, les sols, les eaux douces et les eaux marines, l'air...etc. **(Dedet, 2007)**.

La cellule bactérienne contient 70% d'eau rapporté au poids sec, 55% de protéines, 10% de lipides, 3% de lipopolysaccharide, 3% de peptidoglycane, 40% de ribosomes, 20% d'ARN et 3% d'ADN **(Imelda, 2019)**.



**Figure 2.** La morphologie d'une cellule bactérienne **(Prescott et al., 2013)**.

Quelques chiffres concernant une bactérie-type, *Escherichia coli* : Poids d'une cellule :  $10^{-12}$ g  
Eau: 70 % Poids sec d'une cellule :  $3 \times 10^{-13}$ g Proportion du poids sec : protéines 55 %, lipides 10%, lipopolysaccharide (LPS) 3%, peptidoglycane 3%, ribosomes 40 %, ARN 20 %, ADN 3%  
**(Pierre et Curie, 2003).**

### II. L'appareil nucléaire bactérien

Les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui est le support de l'information génétique. Le chromosome bactérien est un filament d'ADN diffus dans le cytoplasme (non entouré par une membrane nucléaire). Il forme un filament unique d'ADN: circulaire, surenroulé, bicaténaire ayant une taille parfois 1000 fois plus long que la bactérie et un poids moléculaire d'environ  $3 \times 10^9$  Daltons pour les bactéries à tailles standards (**Batraud, 2017**).

Le chromosome bactérien est fortement compacté (surenroulé) à l'intérieur de la cellule grâce à l'action des topo-isomérases ; il occupe une région de forme irrégulière et en contact avec le cytoplasme, cette région présente un point d'ancrage dans la membrane plasmique est appelée nucléotide (**Pierre et Curie, 2003**).

L'analyse chimique de l'appareil nucléaire indique qu'il est composé à 80 % d'ADN (le chromosome), à 10 % d'acide ribonucléique ou ARN (rôle de structuration) et à 10 % de protéines (**UMVF, 2014**).

Ces dernières sont représentées en particulier par les ADN polymérases qui copient les doubles brins d'ADN, les topo-isomérases, surtout les ADN gyrases, qui les déroulent pour permettre l'action des polymérases, et des ARN polymérases qui assurent la synthèse des divers ARN (**Pierre et Curie, 2003**).

Le plasmide est un morceau d'ADN extra chromosomique supplémentaires, plus petit que le chromosome bactérien (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome bactérien), on le trouve généralement chez certaines bactéries sous une forme circulaire, Grace à leur origine de répllication le plasmide a la capacité de répliquer de manière indépendante, par ailleurs il n'est pas indispensable au métabolisme central de la cellule bactérienne. Les plasmides participent aux transferts horizontaux de gènes entre les populations bactériennes, et donc à la dissémination des gènes

conférant des avantages sélectifs (par exemple des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence). Le transfert des plasmides d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse peut se faire par la conjugaison bactérienne (via un *pilus* sexuel) **(Neidhardt et al., 1994)**

### III. Le cytoplasme bactérien

Est un élément constant présent chez toutes les bactéries. Il constitue un hydrogel fluide et aqueux caractérisé généralement d'un pH neutre (7-7,2). **(Pierre et Curie, 2003).**

Le cytoplasme est l'espace délimité par la membrane plasmique et rempli par des différents éléments cellulaires, il est particulièrement riche en ARN solubles (ARN messenger et ARN de transfert) et surtout en ARN particulaire ou ribosomal. Il contient des ribosomes, au nombre de 15000 environ par bactérie, représentent 40 % du poids sec de la bactérie et 90% de l'ARN le cytoplasme contient aussi des substances de réserves et quelques organites spécialisés. Parmi les substances de réserves, l'amidon et plus souvent le glycogène, l'acide hydroxybutirique, des poly-phosphates organiques, du soufre, du fer, etc... **(Pierre et Curie, 2003).**

Le cytoplasme ne contient pas en effet de mitochondries, les enzymes transporteurs d'électrons sont localisés dans la membrane cytoplasmique **(Neidhardt et al., 1994).**

L'ensemble des constituants cytoplasmiques sont placés dans un gel colloïdal, qui contient 80 % d'eau et des substances organiques et minérales, à une pression interne considérable (5 à 20 atmosphères) **(UMVF, 2014).**

### IV. Les ribosomes

Les ribosomes sont des structures complexes composées de protéines et d'ARN. Ils sont de petites granulations sphériques de 20 à 30 nm de diamètre, contenant environ 66% d'ADN ribosomal (ARNr) et 33% de protéines. Les ribosomes bactériens (constante de sédimentation 70S) se dissocient en deux sous-unités : la petite sous unité de Constante de Sédimentation 30S et la grande sous unité de constante de sédimentation 50S. **(Neidhardt et al., 1994)**

Les ribosomes interviennent dans la traduction de l'ARN et la synthèse des protéines. Ils sont associés en chapelets sur l'ARNm pour former des polysomes, la petite sous-unité 30S fixe l'ARNm en premier de son extrémité 5', puis la grande sous-unité se fixe en deuxième lieu sur la

petite sous-unité pour mettre l'ARNm en "sandwich". La sous-unité 50S comporte deux sites; le site A (aminoacyl) qui accueille les ARNt et le site P (peptidyl) qui accueille la chaîne d'aminoacyl en cours de construction. Les acides aminés s'unissent les uns aux autres par des liaisons peptidiques pour former une protéine (**Battraud, 2017**).

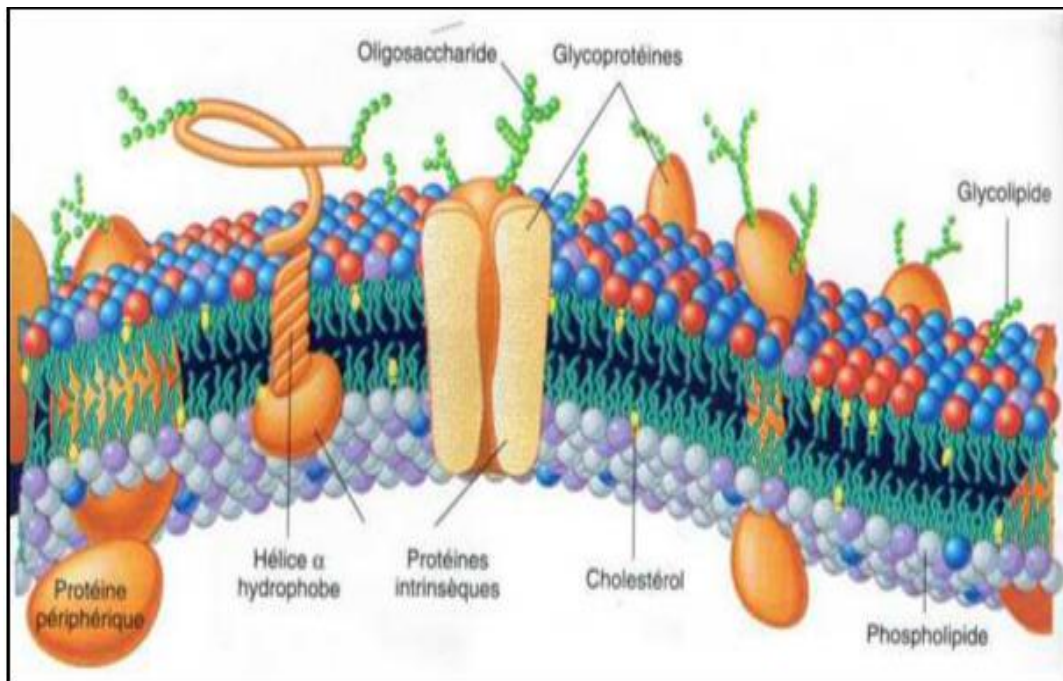
### V. La membrane cytoplasmique

La membrane plasmique (ou cytoplasmique) est un élément de structure fluide qui entoure le cytoplasme et se situe sous la paroi bactérienne. Généralement, c'est une couche fine de 7.5 à 8 nm d'épaisseur, organisée, asymétrique, flexible et dynamique. Au microscope électronique, la membrane cytoplasmique bactérienne apparaît en triple feuillet; deux feuillets denses limitant une couche claire. (**Neidhardt et al., 1994**).

La membrane cytoplasmique bactérienne est principalement constituée de lipides (de 30 à 40%) et de protéines (de 60 à 70%). Elle est composée d'une double couche lipidique c'est le phospholipide qui représente une structure asymétrique avec deux extrémités à savoir une extrémité polaire qui interagissent avec de l'eau (hydrophile) et une autre non polaire (hydrophobe) donc les phospholipides sont des molécules amphipatiques (**Meyer, 2000**).

On distingue deux catégories de protéines membranaires : les protéines périphériques et les protéines intégrales qui traversent complètement le double feuillet. Ces protéines membranaires sont essentiellement des enzymes et des transporteurs tels que les enzymes de la chaîne respiratoire, les perméases et les enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane (**Meyer, 2000**).

Certaines de ces protéines sont des enzymes qui jouent un rôle important dans la synthèse du peptidoglycane et sont appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP) ou penicillin-binding-proteins (PBP) car elles sont également la cible d'action des bêta-lactamines, famille d'antibiotiques à laquelle appartient la pénicilline (**Neidhardt et al., 1994**).



**Figure 3.** La structure de la membrane cytoplasmique (Dib, 2018).

### VI. La paroi bactérienne

Les bactéries sont des cellules particulièrement robustes : elles gardent leur forme même dans des conditions rigoureuses. Une grande partie de cette robustesse est due à leur paroi cellulaire, la paroi bactérienne c'est la couche rigide qui existe juste à l'extérieur de la membrane plasmique, elle présente chez la plupart des bactéries, elle donne à la bactérie sa forme (sphère, bâtonnet ou cylindre spiralé) et la protège contre les composés nocifs qui pourraient endommager la membrane plasmique.

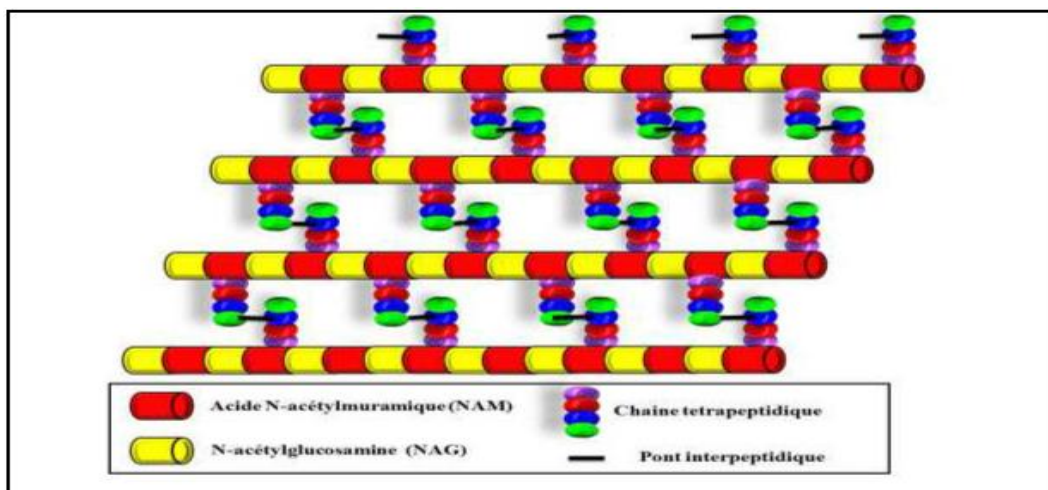
Elle joue un rôle important dans la division cellulaire et constitue le site de nombreux déterminants antigéniques. Plusieurs éléments constituent la paroi bactérienne selon leur nature chimique les composants suivants sont fréquemment retrouvés : Peptidoglycane, acides téichoïques et acides lipotéichoïques, lipopolysaccharides, protéines, lipides et lipoprotéines, la paroi bactérienne peut différer d'une bactérie à une autre dans l'épaisseur, la structure et la composition (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2008).

## Chapitre II. Anatomie fonctionnelle des bactéries

C'est grâce à la technique de coloration de Gram développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode la plus largement utilisée en bactériologie, qu'on a pu classer les bactéries en deux catégories suivant leur affinité pour les colorants liés à la structure générale de leur paroi, il existe deux types de paroi que l'on rencontre chez les bactéries à « Gram positif » et les bactéries dites à « Gram négatif » (**Pierre et Curie, 2003**).

Le peptidoglycane (appelé également la muréine ou mucopeptide) est un constituant clé de la paroi. Comme leur nom l'indique est formé de l'enchaînement des chaînes de peptides et des chaînes de glycanes, les chaînes de glycanes ou polysaccharides est formés de l'alternance de deux glucides aminés N-acétylglucosamine (NAG) et N-acétylmuramique (NAM) associés entre elles par des liaisons  $\beta$ -1-4 glycosidiques et les chaînes peptidiques ou qu'on appelle tétrapeptides permet de lier les chaînes de glycanes entre eux.

Le groupement carboxyle de chaque NAM est substitué par une sous-unité peptidique de cinq résidus d'acides aminés (ex : L-Ala- $\gamma$ -D-Glu- mDAP-D-Ala-D-Ala). Il est à noter que le dernier acide aminé de la chaîne est enlevé en fur et à mesure de l'élongation de la chaîne du peptidoglycane. Les trois acides aminés ; l'acide D-glutamique (D-Glu), la D-alanine (D-Ala) et l'acide méso-diaminopimélique (DAP), ne sont pas présents dans les protéines. Donc, ces acides aminés de la série D empêchent la dégradation par la plupart des peptidases qui reconnaissent que les iso-mères de la série L (**Pierre et Curie, 2003**).



**Figure 4.** La structure de peptidoglycane.

### VII. Les constituantes inconstantes

Il existe des composants obligatoires constants présentes chez toutes les bactéries et des composants dont la présence sont facultatives caractérisent certains types des bactériens (Singleton, 2004).

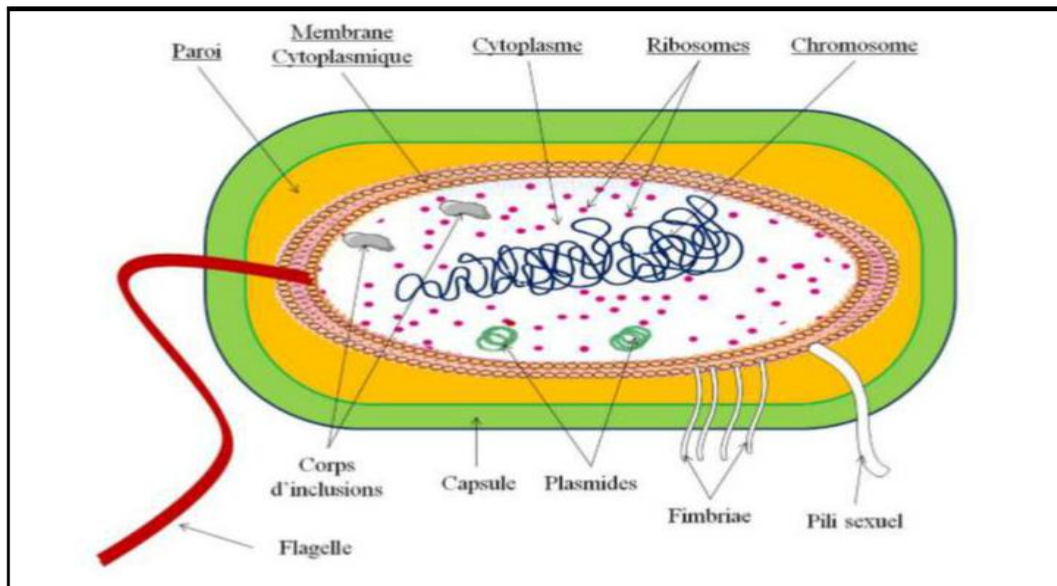


Figure 5. Les composants de la cellule bactérienne

#### VII.1. La capsule

La capsule est une structure inconstante organisée qui forme une couche visqueuse, localisée à l'extérieur de la paroi cellulaire. La nature chimique de la capsule est généralement polysaccharidique : acides polyaldobioniques (ose + acide uronique) et parfois polypeptidiques (Ex : *Bacillus anthracis*). La capsule ne joue pas un rôle vital pour la bactérie mais elle peut être utile à la bactérie grâce à ses rôles. En effet, la capsule protège la bactérie contre les agents physiques et chimiques, la dessiccation, les UV et la fixation des bactériophages. De plus, elle joue un rôle dans le pouvoir pathogène car elle exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes, elle s'oppose à la phagocytose en diminuant l'adhésion des bactéries aux macrophages et elle empêche la pénétration des antibiotiques (UMVF, 2014).

### VII.2. Les *pili*

Les *pili* sont des structures allongées ou capilliformes de nature protéiques qui émergent de la structure cellulaire, on les trouve spécifiquement sur les cellules Gram-négatif. On distingue deux types :

Les *pili* communs: sont des structures protéiques filamenteuse courts et cassants de 0.2 à 2 micromètre de long, très nombreux (parfois quelques centaines par bactérie) disposé régulièrement à la surface de la bactérie **(Pierre et Curie, 2003)**.

Les *pili* sexuel : Plus longs que les *pili* communs (jusqu'à 20  $\mu\text{m}$ ) mais en nombre plus restreint (1 à 4). Ils sont codés par des gènes plasmidiques (le prototype = facteur F). Ils existent uniquement chez les bactéries mâles (donatrices). Ils ont un rôle dans l'attachement des bactéries entre elles (conjugaison) et sont le récepteur de virus bactériens ou bactériophages spécifiques.

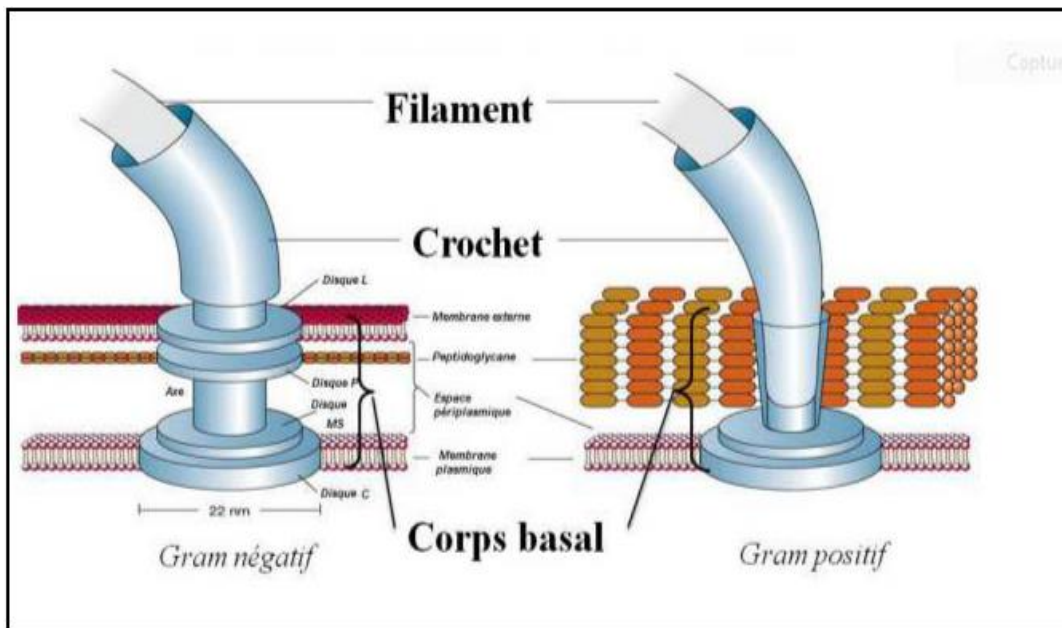
### VII.3. Les flagelles

Les flagelles sont des appendices locomoteurs rigides et fins de nature protéique (composés de flagelline) avec une structure hélicoïdale qui s'étendent de la membrane plasmique jusqu'à l'extérieur en traversant la paroi bactérienne. Selon l'espèce, la cellule peut avoir un seul flagelle (disposition monotriche), un flagelle à chaque extrémité (disposition amphitriche), une touffe de flagelle à une ou deux extrémité (disposition lophotriches unipolaire ou bipolaire) ou des flagelles répartis tout autour de la surface cellulaire (disposition péritriche) **(Fneidhardt et al.,1994)**.

Chaque flagelle comprend un filament, un crochet et corps basal, le flagelle est long de 6-15  $\mu\text{m}$ , il constitue un organe de locomotion des bactéries qu'ils en possèdent. On peut les visualiser dans un laboratoire à l'aide d'un microscope optique par la méthode de Rhodes qui consiste à appliquer le mordant de Rhodes pour 3mn sur un frottis de bactéries flagellées auquel les nitrates d'argent ammoniacal sont rajoutés. Après chauffage jusqu'à ébullition le frottis est laissé 3 à 5 minutes en contact avec le mélange **(Prescott et al., 2013)**.

## Chapitre II. Anatomie fonctionnelle des bactéries

Cette méthode très délicate permet de rendre la structure des flagelles plus épaisse et donc visible au microscope. Le flagelle a un rôle essentiel dans la locomotion et un rôle antigénique est attribué grâce aux flagellines qui sont antigéniques (antigène H) ce qui donne une agglutination en présence d'anticorps correspondants. En clinique, ce rôle est exploité notamment dans le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde (Prescott *et al.*, 2013).



**Figure 6.** L'ultra structure d'un flagelle de bactéries à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droite). (Prescott *et al.*, 2013).

### I. La mutation

Une mutation est une modification de l'information génétique dans le génome d'une cellule. C'est donc une modification de la séquence d'ADN par rapport à la séquence sauvage. Selon la partie du génome touchée, les conséquences d'une mutation peuvent varier (**Klug et al., 2006**).

La mutation est un changement, spontané ou provoqué par un agent mutagène, héréditaire (stable), brusque (discontinu), rare ( $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ ) et indépendant dans les caractères d'une bactérie, et qui est lié à une modification du génome bactérien (ADN). L'ADN bactérien peut être l'objet de variations qui se traduisent par l'apparition de différences héréditaires dans les structures et/ou les fonctions permanentes des bactéries (**Prescott et al., 2013**).

Les mutations sont la source de la plupart des nouveaux allèles et sont à l'origine de la variation génétique dans la population, mais elles sont aussi la source de modification génétique pouvant conduire à la mort cellulaire aux maladies génétiques et aux cancers. Ils permettent l'analyse génétique. La variabilité phénotypique due aux mutations permet aux généticiens d'identifier et d'étudier les gènes responsables d'un caractère muté. C'est à cette raison que Mendel n'aurait pas pu développer ses recherches si tous les plants de pois avaient eu le même phénotype (**Pierre et Curie, 2003**).

### II. Les variations génétiques par transfert de matériel génétique

#### II.1. La transformation

La transformation fut observée la première en 1928 par Frederick Griffith, officier médecin au ministère britannique de la santé, c'est un processus durant lequel la bactérie absorbe un morceau d'ADN libre dans son environnement. Un brin de cet ADN est assimilé et capable de transformer la cellule réceptrice génétiquement en se recombinant avec une région homologue du chromosome. Les cellules bactériennes ne sont pas toujours transformables, lorsqu'elles le sont on dit qu'elles sont compétentes c'est-à-dire elles ont la capacité de synthétiser une protéine appelée facteur de compétence. La transformation bactérienne est divisée en trois étapes qui sont la capture, l'internalisation et l'intégration d'ADN exogène. Griffith a fait des expériences sur différentes souches de *Diplococcus pneumoniae*, certaines souches sont virulentes c'est-à-dire elle est

capable de causer la pneumonie chez certains vertébrés (l'homme, la souris) alors que d'autres étaient non virulentes. ne causent aucune maladie **(Klug et al., 2006)**.

La caractéristique de la virulence est liée à la présence ou l'absence d'une capsule polysaccharidique, les bactéries non virulentes ne possèdent pas la capsule, elles sont détruites par les phagocytes présents dans le système circulatoire de l'animal, tandis que les bactéries virulentes la possèdent, elles se multiplient et provoquent la pneumonie. Les bactéries encapsulées forment des colonies lisses et brillantes sur boîtes de géloses (S) et les bactéries sans capsules produisent des colonies rugueuses (R), c'est grâce à cette caractéristique il est facile de distinguer les souches non virulentes par des techniques usuelles de microbiologie **(Klug et al., 2006) ; (Corbinais, 2020)**.

Griffith déjà savait, qu'une bactérie virulente pouvait induire une pneumonie chez une souris, et si on injecte à une souris des bactéries virulentes tuées par la chaleur on observe que la souris survit et ne développe pas de pneumonie, c'est le cas lorsque l'on injecte des souris par des bactéries non virulentes. Chez une même souris on injecte des bactéries non virulentes vivantes et des bactéries virulentes tuées par la chaleur.

Comme aucun de ses deux types de bactéries ne causent pas la pneumonie et la souris va survivre, Fredrick a supposé que l'injection conjointe ne provoque pas la mort de la souris, mais après cinq jours, les souris sont toutes mortes. Une analyse sanguine a révélé qu'un grand nombre de bactéries non virulentes deviennent virulentes. Griffith a conclu que les bactéries virulentes tuées par la chaleur étaient capables de transférer de l'ADN aux bactéries non virulentes qui acquièrent le pouvoir pathogène. Griffith a appelé ce phénomène « Transformation » **(Corbinais.2020)**.

### II.2. La conjugaison

La conjugaison bactérienne a été découverte en 1946 par Josuah Lederberg et Edouard Tatum chez *Escherichia coli* K12. Les expériences initiales ont été menées chez deux souches multi-auxotrophes, la souche A requiert la présence de méthionine (met) et la biotine (bio) pour se développer, alors que la souche B requiert la présence thréonine (Thr), de leucine (leu) et de la thiamine (Thi). Ni l'une ni l'autre n'est capable de se développer sur un milieu minimum. Les deux souches sont d'abord mises en culture séparément sur des milieux supplémentaires diffé-

rents ; ensuite les cellules sont mélangées et mises en culture ensemble pendant plusieurs générations. Enfin, elles sont étalées sur milieu minimum. Toute cellule se développant sur ce milieu est donc phototrophe, il est fortement improbable que des cellules contenant deux ou trois allèles mutants acquièrent des mutations spontanées simultanément à deux ou trois *loci* indépendants pour devenir des cellules sauvages. Les chercheurs ont supposé que chaque cellule phototrophe isolée résultait d'une forme d'échange et de recombinaison génétique entre les deux souches mutantes (Klug et al., 2006).

Comme la transformation et la transduction la conjugaison est un mécanisme de transfert génétique horizontal entre deux cellules bactériennes *via* des *pili* sexuels. Lors de ce phénomène, une bactérie donneuse appelée F+, qui possède au moins un plasmide conjugatif appelé facteur de fertilité, ce plasmide joue un rôle important dans la conjugaison car il porte les gènes nécessaires à l'attachement cellulaire et à son transfert entre souches spécifiques au cours de la conjugaison. L'information requise pour le transfert du plasmide est contenue dans l'opéron *Tra* qui contient 20 gènes impliqués dans la conjugaison certains gènes codent pour des pilines (protéines constitutives des *pili*), des gènes participent au transfert d'ADN, d'autres codent pour empêcher la conjugaison entre deux bactéries F+ et le facteur F contient également plusieurs séquences appelées séquences d'insertion qui permettent l'intégration du plasmide dans le chromosome. La bactérie donatrice va transférer de l'ADN à la bactérie receveuse dépourvue de plasmide (Mézaache, 2017).

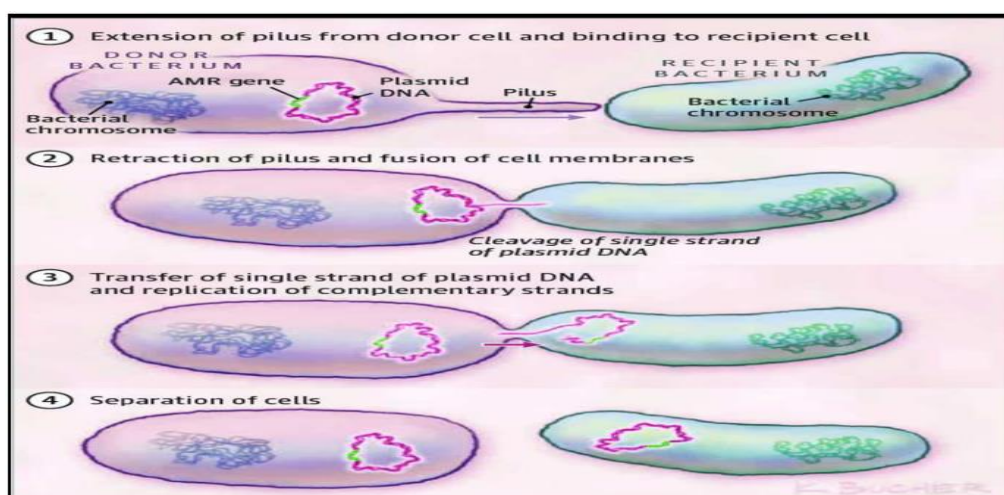


Figure 7. Les étapes de la conjugaison. (Marston et al., 2016)

### II.3. La transduction

Le phénomène a été mis en évidence en 1951 par Zinder et Lederberg chez *Salmonella typhimurium*. Ils ont mélangé les souches auxotrophes LA-22 et LA-2 de *Salmonella*, la souche LA-22 était incapable de synthétiser l'acide aminée phénylalanine et tryptophane ( $\text{Phe}^- \text{Trp}^-$ ) et la souche LA-2 ne pouvait pas synthétiser la méthionine et l'histidine ( $\text{Met}^- \text{His}^-$ ) dans un tube en U de Davis. Les deux souches auxotrophes sont séparées par un filtre en verre qui empêche le contact cellulaire mais permet une croissance dans un milieu minimum. Les prélèvements obtenus des deux côtés de filtre furent étalés de façon indépendante sur un milieu minimum, des phototrophes poussèrent du côté de tube contenant les bactéries LA-22 (**Pierre et Curie, 2003**).

Les cellules LA-2 sont responsable de nouvelle information génétique ( $\text{Phe}^+ \text{Trp}^+$ ), l'agent filtrant qui permet le transfert de ce caractère est un virus de bactérie appelé Bactériophages et le mécanisme appelé la transduction. Les bactériophages connus sous le nom de phages ou virus des bactéries car ils sont pour hôte les bactéries. Durant leur cycle de reproduction, les phages sont impliqués dans la transduction pour comprendre ce processus il faut d'abord connaître la structure et les deux cycles de vie des phages (**Klug et al., 2006**).

**La transduction spécialisée :** Dans la transduction spécialisée un morceau d'ADN bactérien est empaquetée avec l'ADN du phage, le bactériophage transfère seulement les gènes adjacents au point d'insertion.

**La transduction généralisée :** Dans ce type de transduction l'ADN du phage est exclu, il y a seulement un transfert d'ADN bactérien. Lors de la transduction généralisée l'ADN est injectée dans la cellule hôte au lieu de l'ADN viral, il peut soit resté dans le cytoplasme, soit recombiner avec la région homologue du chromosome de l'hôte. Si l'ADN bactérien reste dans le cytoplasme il ne réplique pas, lors de chaque division l'ADN se transmet à l'une des cellules filles ce phénomène appelé transduction abortive. Si l'ADN bactérien se recombine avec la région du chromosome hôte qui lui est homologue, les gènes transduits se répliquent normale et sont transmis à toutes les cellules filles ; ce phénomène appelé transduction complète (**Marston et al., 2016**).

L'identification des microorganismes se fait souvent par des méthodes classiques de microbiologie ; mais ces méthodes se limitent aux bactéries cultivables. Cependant, la biologie moléculaire pourrait rendre possible la détection des microorganismes indétectables par les méthodes microbiologiques et permet aussi leur identification. Les méthodes moléculaires pourraient aussi réduire les risques de contaminations car ici le travail porte sur l'ADN et non directement sur les microorganismes.

### I. Technique d'amplification ou Polymerase Chain Reaction (PCR)

C'est une technique développée par Kary Mullis en 1983 il s'agit d'une réplique in vitro de séquences spécifiques d'ADN. C'est une réaction enzymatique rapide qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité (Klug *et al.*, 2006).

#### I.1. Les acteurs de la PCR

##### I.1.1. L'ADN à amplifier

Avant la réaction de la PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (cheveux, salive, sang...), l'extraction peut être manuelle ou automatisée. Il faut connaître la séquence d'ADN à amplifier, pour synthétiser deux amorces une pour chaque extrémité (3' et 5').

(Diarra, 2013).

##### I.1.2. Les deux amorces

Elles sont des oligonucléotides synthétiques (15-30 de long) complémentaires des séquences encadrant l'ADN cible à copier. Le choix des amorces est crucial. Les amorces doivent être choisies de sorte à minimiser les possibilités d'appariement entre elles. Les dNTP (désoxynucleotide triphosphate), Les 4 nucléotides (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) sont utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser le nouveau brin. L'appariement des nucléotides se fait par complémentarité de bases. (Klug *et al.*, 2006).

##### I.1.3. La Taq polymérase enzyme thermorésistante

On utilise une ADN polymérase purifiée ou clonée à partir d'une bactérie extrêmophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures supérieures à 100°C. Cette polymérase (Taq polymérase) possède la caractéristique remarquable de résister à des tem-

pératures de l'ordre de 100°C, lesquelles sont généralement suffisantes pour dénaturer la plupart des protéines. *Thermus aquaticus* trouve sa température de confort à 72°C, température optimum pour l'activité de sa polymérase (**Juzan et al., 2012**).

### I.1.4. Le tampon et les ions (MgCl<sub>2</sub>)

Le magnésium Mg c'est un cofacteur. Le tampon est utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (**Bezzar, 2014**).

### I.1.5. Le thermocycleur

Au début des années 80 les chercheurs n'avaient pas encore de thermocycleur. Ils utilisent une petite anecdote, pour changer la température ils devaient passer les tubes d'un bain marie à l'autre. Par contre sur un thermocycleur, la température et la durée des trois étapes de chaque cycle d'amplification, ainsi que le nombre de cycles souhaités sont programmés (**Klug et al., 2006**).

### I.1.6. Le milieu réactionnel

Le milieu de la PCR doit contenir l'ADN à amplifier, les dNTP, les deux amorces, la taq polymérase, un tampon et les ions magnésium MgCl<sub>2</sub>, ces deux derniers composants définissent un milieu avec un PH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme. (**Klug et al., 2006**).

## I.2. Les cycles de PCR

La réaction PCR consiste en une succession de réactions chimiques appelées **cycles** chaque cycle comprend trois étapes dénaturation, hybridation et élongation. Et dont chacune sera pilotée par une température différente. (**Béréziat, 2004**).

### I.2.1. Dénaturation

Durant cette étape les liaisons hydrogènes se rompent à une température comprise entre 90-95°C, l'ADN double brin se transforme en un ADN simple brin (**Béréziat, 2004**).

### I.2.2. Hybridation

La température de la réaction est baissée jusqu'à une valeur comprise entre 42 et 68 à cette étape les deux amorces sont hybridées, à l'ADN simple. Les amorces servent de point de départ à la synthèse des nouveaux brins d'ADN (Klug *et al.*, 2006).

### I.2.3. Elongation

On utilise une ADN polymérase purifiée ou clonée à partir d'une bactérie extrêmophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures supérieures à 100°C. La taq polymérase est ajoutée au mélange réactionnel. L'élongation s'effectue à des températures comprises entre 70 et 75, la taq allonge les amorces par addition des nucléotides dans le sens 5' vers 3' par complémentarité de bases ce qui génère une copie double brin de l'ADN cible (Klug *et al.*, 2006).

Le nombre de copies de l'ADN cible est doublé à chaque cycle, parce que les nouveaux brins s'ajoutent au anciens pour servir de matrice au cycle suivant, chaque cycle dure environ 5 min. On obtient plusieurs milliards de copies, au bout de trente cycles  $2^{30}$ , qui pourront être utilisées à des fins variées, comme le clonage dans des vecteurs plasmidiques, le séquençage d'ADN, le diagnostic clinique ou le criblage génétique. (Klug *et al.*, 2006).

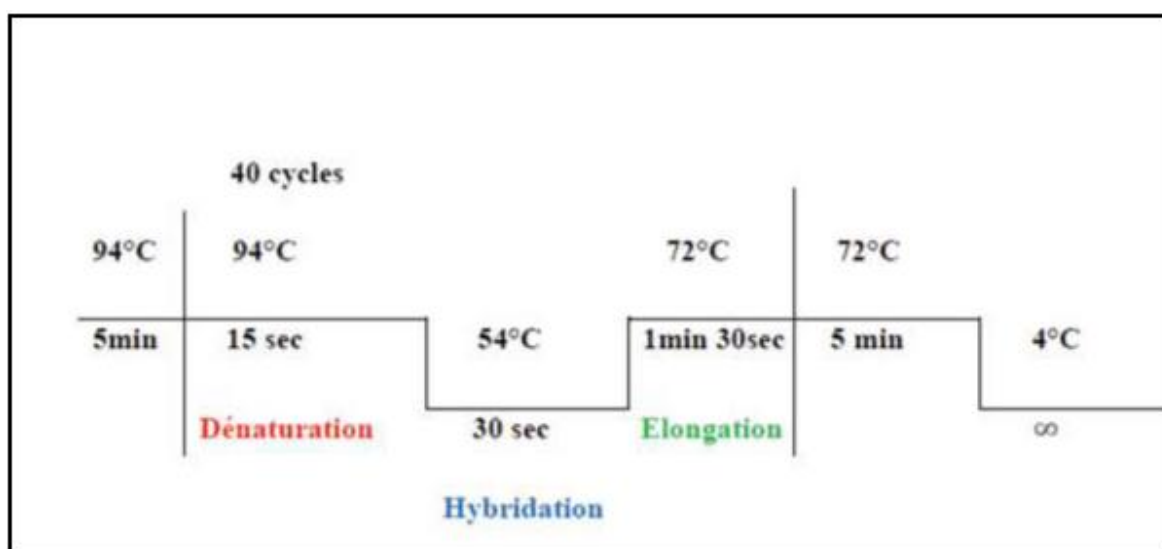


Figure 8. Les cycles de PCR. (Bezzar, 2014)

### I.3. Variantes associées à la PCR

#### I.3.1. PCR quantitative ou PCR en temps réel

Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. La PCR en temps réel permet d'obtenir des résultats plus rapidement qu'avec la PCR conventionnelle en se basant sur la relation entre la quantité d'amplicons initiale présents dans l'échantillon et la quantité du produit formé durant chaque cycle utilisant un marqueur fluorescent (le marqueur fluorescent peut être liée à la sonde ou une molécule fluorescente capable de s'intercaler au double filament d'ADN), le niveau de fluorescence émis par la sonde est proportionnel à la quantité du fragments amplifiés. Les résultats sont interprétés en utilisant un logiciel spécialisé une des meilleures méthodes d'analyse est de contrôler d'abord les témoin (positifs et négatifs), le témoin positif devrait avoir une courbe sigmoïde indicative de l'augmentation du signal fluorescent trois phases peuvent être identifiées sur la courbe une phase exponentielle initiale, une phase linéaire ou la fluorescence redouble à chaque cycle et une dernière phase ou les réactifs s'épuisent, les témoins négatifs d'extraction de PCR ne doivent donner qu'une ligne droite car en absence d'ADN d'intérêt il n'y a pas de signal fluorescent et donc pas de courbe. **(Peccoud, 1993 ; Christian *et al.*, 2020).**

#### I.3.2. La RT-PCR

Cette technique permet de travailler à partir d'ARN qui est rétro-transcrit par une transcriptase inverse en ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est utilisé pour réaliser une PCR, les deux étapes puissent se faire sans avoir ouvrir le tube. Cela permet de réduire le risque de contamination ou d'invasion d'échantillon **(Rubi *et al.*, 2019).**

### I.4. Application de la PCR

La PCR et ses variantes ont beaucoup d'autres applications. La PCR peut identifier rapidement des variant de sites de restriction aussi bien que des variations dans la séquence d'ADN répétée en tandem, qui peuvent être utilisées comme des marqueurs génétiques pour les études de cartographie génétique **(Jana *et al.*, 2005).** C'est l'une des applications les plus remarquables de la PCR. Elle permet d'isoler, c'est-à-dire de purifier un gène sans recourir aux méthodes traditionnelles de clonage moléculaire qui consistent à insérer une banque d'ADN dans un vecteur plas-

midique qui est ensuite employé à transformer une souche bactérienne dont les clones, après sélection, sont criblés. La réalisation est beaucoup plus rapide et beaucoup moins aléatoire en utilisant la PCR (**Juzane et Pernelle, 2012**).

### II. Technique de gel électrophorèse en conditions dénaturantes (DGGE)

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est une technique de biologie moléculaire visant à séparer des molécules d'ADN de taille identique mais de séquence variable dans un gel contenant un agent dénaturant, les fragments d'acide nucléique sont soumis à différentes concentrations croissantes en dénaturant. Les deux brins d'ADN se séparent plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases, La molécule la plus stable migrera moins vite que celle qui se dénaturera dans le gradient (**Dieye, 2011**).

L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou DGGE) est une technique d'électrophorèse dénaturante mise au point par Fischer et Lerman (1983) (**Huybens et al., 2009**).

#### II.1. Principe de la DGGE

Le principe de la DGGE est fondé sur la séparation d'un double brin d'ADN sous l'action de la température de fusion  $T_m$  ou d'un agent dénaturant, la température à laquelle le duplex est détruit est conditionnée par deux facteurs : (**Corre, 2000**).

- Le nombre de liaisons hydrogène entre les bases complémentaires, la liaison des paires GC (3 liaisons hydrogène) est détruite à une température plus élevée qu'une liaison faible des paires AT (2 liaisons hydrogènes) ; les liaisons des paires AT sont plus faibles et vont donc se dissocier en premier, les liaisons des paires CG se sépareront donc à une température ou une concentration plus forte.
- L'attraction entre des bases voisines sur un même brin ou "stacking" ; Les molécules d'ADN de même taille mais différant d'un seul nucléotide dans une zone à faible température de fusion, auront deux températures de fusion différentes. Lors d'une migration électrophorétique dans un gradient croissant de dénaturant, la mobilité de la molécule d'ADN décroît alors que les zones à faible température de fusion se dissocient, la migration dans le gel s'arrête lorsque les deux brins d'une molécule d'ADN se séparent donc la structure de l'ADN double brin se dissocie

en simple brin (**Corre, 2000**). Cette technique permet de séparer des fragments de même taille en fonction de leur  $T_m$ , donc leur composition nucléotidique ; une augmentation du pourcentage en GC (3 ponts hydrogènes) par rapport au pourcentage en AT (2 ponts hydrogènes) augmente le  $T_m$  de la molécule pour une taille donnée. Afin d'éviter la séparation complète ou la dénaturation totale des deux brins d'ADN, une séquence à très haute température et riche en GC est ajoutée à l'une des amorces lors de l'amplification. Une PCR est alors réalisée à l'aide d'une amorce (GC pince) portant en 5' une succession de 40 GC, Cette pince GC permet de garder les deux brins d'ADN attachés par cette extrémité grâce à la série de triples liaisons hydrogènes entre les guanines et les cytosines. (**Huybens et al., 2009**).

Il est possible d'obtenir un profil dans l'électrophorégramme caractéristique des séquences d'ADN. En effet, la séparation de l'ADN va se faire en fonction des pourcentages en paires de bases GC, puisque plus la séquence comportera de paires de base CG plus elle migrera loin. (**An-sellem, 2011**).

La technique DGGE permet de détecter des mutations de type : substitutions, des petites insertions ou délétions dans les séquences d'ADN de 200 à 700 bp. (**Djamaa, 2013**).

### III. Le clonage moléculaire

Le clonage moléculaire est une technique de base du génie génétique qui permet d'isoler et de reproduire des gènes, il repose sur l'insertion d'un fragment d'ADN exogène (étranger) dans une petite molécule d'ADN capable de se répliquer de façon autonome. Ce type de molécule d'ADN est appelé un vecteur de clonage (plasmide, bactériophage, cosmide, YAC, BAC ...). L'ADN du vecteur de clonage est coupé par une enzyme de restriction qui reconnaît un site de coupure spécifique et unique, le vecteur est donc linéarisé et possède à chaque extrémité une partie de la séquence d'ADN reconnue par l'enzyme de restriction (**Timothée et al., 2005**).

L'ADN exogène de l'organisme donneur est digéré par la même enzyme de restriction que celle utilisée pour la linéarisation du vecteur, les différents fragments obtenus possèdent donc également à leurs extrémités une partie de la séquence d'ADN reconnue par l'enzyme de restriction. Lorsque le plasmide est ouvert, linéarisé, et les fragments de l'ADN donneur sont confrontés, il y a hybridation par la formation de liaisons hydrogène entre des extrémités cohésives complémen-

## Chapitre IV. Caractérisation moléculaire des microorganismes

taires, suivant les lois de complémentarité des bases (A/T, C/G). Une enzyme, une ligase, permettant la formation d'une liaison covalente entre ces fragments d'ADN hybridés, est alors ajoutée pour ligaturer le fragment d'ADN étranger au plasmide. L'action de la ligase est de créer des liaisons phosphodiester (les extrémités 5'-P et 3'-OH) rendues adjacentes par hybridation des extrémités cohésives du fragment et du plasmide. Le plasmide obtenu, de nouveau circulaire, est dit recombinant s'il a intégré un insert. Ensuite ce plasmide recombinant est introduit dans une cellule hôte qui indépendamment de cet hôte est capable de se multiplier. (Dieye, 2011).

Une fois le plasmide inséré dans la cellule hôte, il pourra être amplifié, ou exprimé en vue de la production de la protéine recombinante correspondante à l'insert (le gène), selon les besoins de la cellule. Historiquement, les premières expériences de production des protéines humaines dans les bactéries furent des protéines d'intérêt thérapeutique comme l'insuline (1979). La production de protéines ou l'élaboration d'organismes transgéniques ne sont pas des techniques limitées aux bactéries. D'autres méthodes de transformation peuvent aussi être employées, par exemple l'utilisation de vecteurs différents des plasmides (virus modifiés, phages, cosmides, phagemides, etc). (Timothée *et al.*, 2005).

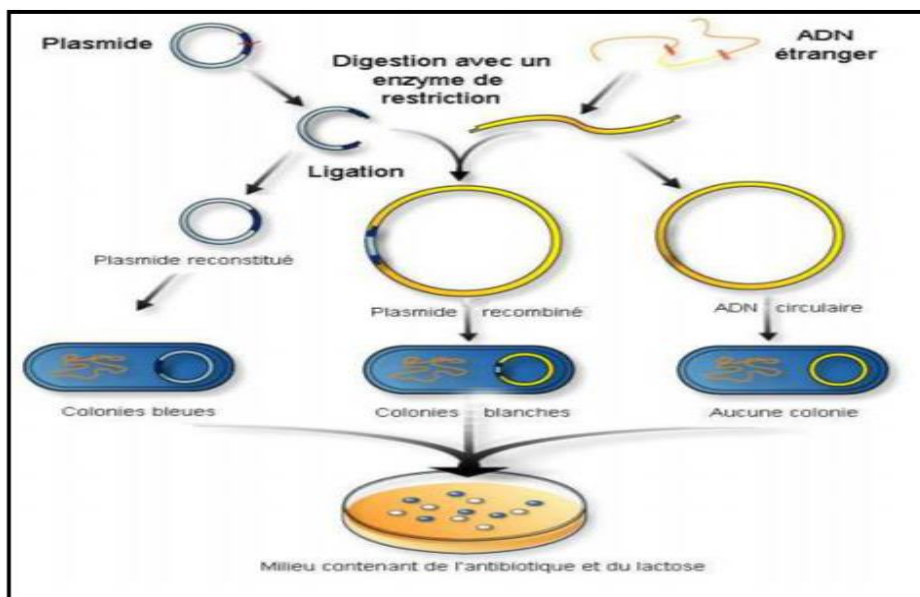


Figure 9. 1Processus de clonage moléculaire. (Benslama, 2017).

### IV. Le séquençage

La possibilité de séquencer l'ADN à fortement fait progresser notre compréhension de l'organisation du génome et à augmenter notre connaissance des gènes (structure fonction...).

**(Klug et al., 2006).**

Le séquençage d'ADN est devenu un outil essentiel en biologie moléculaire tant en médecine que dans de nombreuses autres disciplines des sciences de la vie. Il est devenue une technique courante dans les laboratoires de biologie moléculaire. Les connaissances acquises grâce à cette méthode et la possibilité de séquencer des génomes de grande taille, tel que le génome humain, ont amené les chercheurs à développer des techniques de séquençage de plus en plus sophistiquées.

**(Jennifer, 2012).**

Le séquençage de l'ADN Consiste en une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des nucléotides d'une molécule d'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci. **(Ahakoud, 2015)**

La technologie de séquençage a connu trois générations : La technique de Sanger constitue avec celle de Maxam et Gilbert le séquençage de première génération en 1977, le séquençage moderne NGS (séquençage deuxième génération) et le séquençage troisième génération. **(Klug et al., 2006).**

La méthode la plus couramment utilise est la technique de Sanger, Elle a révolutionné le monde de la biologie moléculaire en permettant de décrypter différents génomes, tel que celui du gé-nome humain complètement déchiffré en 2006 ou d'autres génomes, le génome bactérien, par exemple, le premier d'entre eux étant celui *d'Haemophilus influenzae*, complètement décrit en 1995 (1918-2013). **(Claire et al., 2014).**

Dans cette procédure une molécule d'ADN dont la séquence est à déterminer est dénaturée en simple-brin, qui sert de matrice pour la synthèse des nouveaux brins complémentaires. Chaque brin néo-synthétisés se termine par un nucléotide distinct, le résultat serait une série de fragments d'ADN qui sont séparés par électrophorèse et analysés pour obtenir la séquence d'ADN. la première étape de cette réaction consiste à chauffer l'ADN à séquençer pour la dénaturation et la formation d'ADN simple brin. L'ADN simple brin est mélangé avec des amorces qui s'hybrident

## Chapitre IV. Caractérisation moléculaire des microorganismes

à l'extrémité 3' de l'ADN. Des échantillons de l'ADN simple-brin lié aux amorces sont répartis dans quatre tubes, Puis l'ADN polymérase et les quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) sont ajoutés dans chaque tube en concentration équimolaire. A l'étape suivante, chaque tube reçoit une petite quantité d'un désoxyribonucléotide modifié, appelé didésoxynucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Un des désoxynucléotides ou bien l'amorce est marquée avec la radioactivité pour l'analyse ultérieure de la séquence par électrophorèse. **(Claire et al., 2014)**.

La NGS séquençage à haut débit (2005) est une variété des techniques de séquençage qui ont apporté des améliorations au processus initiale de Sanger. Elle permet de décrypter rapidement et pour un coût relativement raisonnable le génome complet d'une personne **(Jennifer , 2012)**.

Les bactéries ayant un fort pouvoir pathogène semblent être à l'origine de nombreuses pathologies allant de la plus banale aux affections gravissimes qui peuvent mettre le pronostic vital des patients en danger. Une prise en charge non-adaptée (soit par un retard du diagnostic en se basant sur les techniques d'identification classiques qui semblent durer plusieurs jours parfois même des semaines si la bactérie cultive lentement, soit par erreur de diagnostic en raison de la grande fréquence de faux positifs ou négatifs puisque – comme vous le savez tous- ces techniques n'offrent parfois qu'une faible sensibilité et spécificité d'identification, ce qui peut avoir des conséquences dramatiques surtout si la bactérie est trop virulente.

Et comme disent les français « la nécessité est la mère de l'invention », les savants ont essayé par tous moyens de trouver de meilleures techniques pour une prise en charge plus rapide, plus adaptées à chaque situation clinique afin de sauver plus de patients et surtout de prescrire toujours les antibiotiques qui sont reconnus efficaces pour la souche intéressée afin d'éviter l'émergence de nouvelles résistances à ces drogues mettant ainsi en péril la vie des êtres-humains. Hélas, en raison de l'automédication et de l'utilisation aléatoire de ces médicaments certaines souches isolées récemment semblent être rebelles à tout traitement antibiotique !

Et c'est ainsi qu'ont apparus les techniques de la biologie moléculaire qui représentent essentiellement des moyens complémentaires à l'étude classique des bactéries, par ailleurs la biologie moléculaire est parfois le seul outil capable de faire une caractérisation génétique des bactéries. Cette caractérisation permet de mieux comprendre les mécanismes de virulence et de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Notre travail a comme objectif principal de détailler l'enchaînement des différentes étapes sur lesquelles se basent ces techniques, allant de l'isolement de la souche à étudier pour aboutir en fin de compte à un séquençage du génome bactérien offrant une meilleure compréhension de l'expression de ces gènes dans le but d'avoir une image soi-disant complète de leurs mécanismes de virulence et ainsi de leurs implications en pathologie humaine.

1. **Ahakoud M., (2015).** Le séquençage d'acide désoxyribonucléique : principe indication médicale et expression du chu Hassane 2 de Fès.
2. **Ababou H. Daffi S., Benmostefa A., (2010).** Les prélèvements en microbiologie Unlverslty Abou Bakr belkaid Tlemcen.
3. **Ansellem, (2011).** Les outils pour décrire la biodiversité.
4. **Battraud P., (2017).** La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité. Thèse pour le diplôme d'état de doctorat en pharmacie. Université de Lille 2.
5. **Benslama A., (2017).** Cours de génie génétique. Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie Département des sciences de la nature et de la vie. Université Mohamed Khider-Biskra
6. **Béréziat O., (2004).** Application de la PCR en temps réel au diagnostic des candidémies spécialisées de biologie médicale.
7. **Bezzar N., (2014).** Caractérisation génétique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des souches de *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalière. Option: Microbiologie, grade de master en Biologie moléculaire et cellulaire.
8. **Christian A. Heid, Junko S, Kenneth J. L, and Williams P. M., (2020).** Real Time Quantitative PCR, - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1BioAnalytical Technology Department, Genentech Inc., South San Francisco, California 94080; 2Applied BioSystems Division of Perki Elmer Corp., Foster City, California 94404.
9. **Claire. M. F., Jonathan A. Eisen & Steven L., (2014).** Microbial genome sequencing. The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, Maryland 20850, USA.
10. **Corbinais C., (2015).** Etude des premières étapes de la transformation naturelle chez *Helicobacter pylori*. Microbiologie et Parasitologie. Paris VI. Français. Thèse de doctorat de l'université de pierre et marie curie école doctorale.
11. **Corne P., (2004).** *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de doctorat, Montpellier.
12. **Corre E., (2000).** Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes : les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale (Mention Microbiologie). Université de Bretagne Occidental.

- 13. Dedet J.P., (2007).** La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. 50806 - (I) - (1,5) - OSB 80° - TYP - JME Imprimerie CHIRAT - 42540 Saint-Just-la-Pendue Dépôt légal , en France.
- 14. Diarra A. S., (2013).** Étude comparative de la PCR classique et de la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites dues à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* de type b, Faculté de PHARMACIE, Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako).
- 15. Dib W., (2018),** Thermodynamique des transports membranaires licence 3 en biochimie, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- 16. Dieye T., (2011).** Caractérisation par des outils de biologie moléculaire des microorganismes des boues de station d'épuration utilisées en agriculture périurbaine. Mémoire de Diplôme de Master II en Biologie Animale Spécialité : génétique des populations.
- 17. Djamaa I., (2013).** Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic des bêta thalassémies et drépanocytose. Université de Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers Département d'Ecologie et Environnement.
- 18. Drouet E., (2012).** Le monde Microbien : Partie 1 : Microbes et Microbiologie. Université Joseph Fourier de Grenoble.
- 19. Guezlane T.N, Kahlouche.B., Athmani G., (2008).** Microbiologie Travaux pratiques. Office des publications universitaires. Alger.
- 20. Hart T. Shears P., (1997).** Atlas de poche de microbiologie. I<sup>re</sup> édition, 2<sup>e</sup> tirage, 1999, Traduit de l'anglais par Olivier Gaillo.
- 21. Huybens N, Mainil J. et Marlier D., (2009).** article de synthèse .Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. Formation continue.
- 22. Imelda A., (2019).** Analyse de la prescription des antibiotiques dans le service de Médecine Interne du Centre Hospitalier et Universitaire du Point G. Thèse de pharmacie, université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako.
- 23. Jana T, Singh N .K, Koundal K. R, and, Sharma T. R., (2005).** Genetic differentiation of charcoal rots pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR.
- 24. Jean M, Sébastien C., (2015).** Les outils de biologie moléculaires et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollués.

- 25. Jennifer S., (2012).** Développement de méthodes de séquençage de seconde génération pour l'analyse des profils de méthylation de l'ADN. Biologie moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. Français.
- 26. Juzan L, Pernelle J.J., (2012).** Les outils de biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées. Sciences Eaux & Territoires, INRAE, 2012, p. 76 - p. 81.
- 27. Klug W, Cummings M., Spencer C., (2006).** Génétique. 8<sup>e</sup> édition, traduction française coordonnée par Louise Blottière.
- 28. Marston H.D., MD, MPH, Dennis M. Dixon, PhD; Jane M. Knisely, PhD; Tara N. Palmore, MD, Anthony S. Fauci, MD., (2016),** Article in JAMA The Journal of the American Medical Association · Antimicrobial Resistance.
- 29. Mehamidia N., Moussa S., (2014)** Mécanismes de la résistance aux antibiotiques
- 30. Meyer A., Deiana, J., Leclerc, H., (2000).** Cours de microbiologie générale: nouveau programme. Paris: Doin
- 31. Madoui M., Taoudiat Z., (2018).** Etude comparative des méthodes d'analyses microbiologiques (classique et alternative) pour les produits du complexe Cevital.
- 32. Mézaache A., (2017)** Génétique Microbienne 3<sup>ème</sup> année licence Microbiologie.
- 33. Neidhardt F.C, Ingraham. J.L., Schaechter. M., (1994).** Physiologie de la cellule bactérienne. Traducteur. J.P. Bohin.
- 34. Peccoud J., (1993).** La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale, TIMGIMAG, URA Cnrs D 1 61 8. Faculté de médecine de Grenoble, France.
- 35. Perron K., Schrenzel J., Linder P., (2010).** Des bactéries et des hommes. De la santé au développement durable. Université de Genève. Faculté de médecine. Centre médical universitaire 1 rue Michel Servet.
- 36. Pierre et Curie M., (2003).** Bactériologie. Université Paris-VI.
- 37. Prescott L. M., Willey J., M., Sherwood, L., Woolverton, C. J. Prescott, L. M., (2013).** Microbiologie. De Boeck 4<sup>ème</sup> édition.
- 38. Rubi G., Sahr M., Ghiasun N.T., (2019).** Comparison of Quantitative *Hepatitis B Virus* DNA Real Time PCR (RT-PCR) With Reverse Transcription PCR(rt-PCR) Central Research Lab PGMI, Lahore General Hospital, Department of Research Lab and Molecular Genetics Pathology, University of Health Sciences, Pakistan.

- 39. Singleton P., (2004).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie. Traduit de l'anglais par Jean Dusart.6 édition.
- 40. Timothée L, Vincent C., (2005).** Introduction à la Biologie Moléculaire. Timothée Lionnet et Vincent Croquette.
- 41. UMVF. (2014).**, Collégiale des enseignants de bactériologie- virologie –hygiène. Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie - Université médicale virtuelle francophone.
- 42. Yahiaoui .B., (2014).** Le monde microbien. FSNV Université de Sétif 1.