

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

- Slimane Taleb Kenza
- Saffar Fatiha
- Tadge Linda

Thème

**Etude biologique des effets des microondes
sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus***

Soutenu le : 28/10/2020

Jury :

Président : M^r SASSI M.

Encadrante : M^{lle} HAOUZI R.

Examinatrice : M^{lle} MEZOUAR D.

Grade

« Professeur »

« MAA »

« MCB »

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Tout d'abord et avant tout nous remercions le **DIEU** d'avoir nous donné la capacité, la patience et la volonté de réaliser ce modeste travail.

Nous voudrions exprimer toute notre gratitude à notre promotrice **M^{lle} Haouzi Romaissa**, pour ses orientations, ses encouragements, sa patience, sa disponibilité, et pour ses précieux conseils,

Tous nos remerciements, et respects à **M^r Sassi Mohamed** pour son enseignement ainsi pour avoir accepté de présider le jury d'examen,

Nous remercions également **D^r Mezouar Djamila**, d'avoir accepté d'examiner notre mémoire,

Enfin un grand Merci à tous nos enseignants de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour leur enseignement édifiant et instructif.

Dédicace

Grâce à **ALLAH** que j'ai pu arriver au stade d'achever ce
modeste travail que je dédie :

_ En premier lieu, à ma **Mère** la personne qui mérite plus que
des mots simples qui n'exprime jamais mon amour, mon
respect et ma fierté d'être sa fille, aussi à mon très chère **Père**,
je leur souhaite la santé, le bonheur et le bien-être, qu'ils
trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de
leurs efforts ainsi que l'expression de ma grande gratitude.

_ A mes **Sœurs** (O, S) et leur petite familles (B, N, L, M, Y,
N), je leur souhaite une longue belle vie pleines de joies et de
bonheurs, ainsi mes frères (C, M, O) ;

Et à toutes ma familles (tantes, oncles, cousines ...), et mes
amies (N, H, F, L, K) que dieu les protège tous,

In Shaa' Allah

Kenza

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le

Symbole de la bonté par excellence, la source de

Tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé

De m'encourager et de prier pour moi.

A mon très cher père

Qui est sacrifié leur vie pour

Ma réussite et il m'a éclairé le chemin par

Leurs conseils judicieux.

Je dédie aussi ce travail :

À mes frères et mes Sœurs,

A tous mes nièces et neveux,

A ma famille paternelle et maternelle et mes amis Kenza et Linda.

Fatiha

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma famille, qui m'a doté d'une éducation digne,

Son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

Particulièrement à mère qui m'a encouragé durant toutes mes

Etudes, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu.

A mon père, qui est toujours disponible pour nous, et

Prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

A ma grande mère

A vous mes frères (T, A) et sœurs (N, A, R, S) qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A mes amis (S, F, K, H, B)

Et à tous ceux que j'ai connus durant mon cycle d'étude.

LINDA

Table des matières

Liste des figures	i
Liste des tableaux	iii
Liste des abréviations	iv
Introduction	1

Chapitre I : Matériel et méthodes

I-1 MATERIEL.....	3
I-1-1 Matériel biologique.....	3
I-1-2 Matériel d'irradiation	3
I-1-2.1 Klystrons	3
I-1-2.2 Magnétron.....	4
I-1-3 Autre matériel.....	5
I-2 METHODES	7
I-2-1 Tests de confirmation des souches bactériennes choisies	7
I-2-1.1 Aspect macroscopique	7
I-2-1.2 Aspect microscopique	7
I-2-1.3 Caractères biochimiques	9
I-2-2 Préparation des suspensions bactériennes et échantillonnage... 11	
I-2-3 Dénombrement des cellules bactériennes.....	11
I-2-4 Irradiation des souches <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	12
I-2-5 Etude des bioeffets des microondes sur les bactéries <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	12
I-2-5.1 Bioeffets sur la paroi cellulaire (morphologie).....	12
I-2-5.2 Bioeffets sur la membrane plasmique	13
I-2-5.3 Bioeffets sur l'ADN	13
I-2-5.4 Bioeffets sur certains caractères biochimiques	15
I-2-6 Études comparatives entre les bioeffets des MO sur <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	16

Chapitre II : Résultats et discussion

II-1 RESULTATS.....	18
II-1-1 Confirmation des souches bactériennes choisies	18
II-1-1.1 Aspect macroscopique	18

Table des matières

II-1-1.2 Aspect microscopique	19
II-1-1.3 Caractères biochimiques	20
II-1-2 Dénombrement des cellules bactériennes.....	22
II-1-3 Bioeffets des microondes sur les bactéries <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> ...	24
II-1-3.1 Bioeffets sur la paroi cellulaire (morphologie).....	24
II-1-3.2 Bioeffets sur la membrane plasmique	25
II-1-3.3 Bioeffets sur l'ADN	26
II-1-3.4 Bioeffets sur certains caractères biochimiques	28
II-1-4 Etudes comparatives entre les bioeffets des MO sur <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	30
II-1-5 Paramètres affectant les bioeffets des MO.....	32
II-1-5.1 Puissance et temps.....	32
II-1-5.2 Volume	33
II-1-5.3 Milieux de culture et leurs compositions	33
II-2 DISCUSSION.....	35
Conclusion	39
Références bibliographiques	40
Résumé	

Liste des figures

Figure 01 : photo d'un klystron	p. 04
Figure 02 : schéma d'un magnétron	p. 04
Figure 03 : schéma du protocole expérimental	p. 06
Figure 04 : schéma de technique d'examen à l'état frais	p. 08
Figure 05 : schéma de la technique de coloration de Gram	p. 09
Figure 06 : schéma de la technique de recherche de l'indole et de l'urée	p. 10
Figure 07 : schéma de la technique de test de catalase	p. 10
Figure 08 : protocole de Wizard Genomic DNA Purification Kit ®	p. 14
Figure 09 : schéma de technique d'étude de l'activité de β -galactosidase chez les coliformes fécaux	p. 16
Figure 10 : photo des colonies d' <i>E. coli</i> sur un milieu de MacConkey	p. 18
Figure 11 : photo des colonies de <i>S. aureus</i> sur une gélose de Chapman	p. 18
Figure 12 : photo d' <i>Escherichia coli</i> après coloration de Gram, (x500)	p. 19
Figure 13 : photo des <i>S. aureus</i> après la coloration de Gram, (x1500)	p. 19
Figure 14 : photo des résultats d'incubation des <i>E. coli</i> dans le milieu de Kligler-Hajna (à la gauche), le milieu Kligler-Hajna non ensemencé (à droite)	p. 20
Figure 15 : photo des résultats d'incubation d' <i>E. coli</i> dans le milieu urée-indole.	p. 20
Figure 16 : photo d' <i>E. coli</i> dans le milieu urée-indole + kovacs	p. 21
Figure 17 : photo d'une réaction de catalase produite en présence <i>S. aureus</i>	p. 21
Figure 18 : modification du nombre des cellules viables et de la densité cellulaire dans les suspensions d' <i>E. coli</i> , par rapport à la température produite par le rayonnement MO	p. 22
Figure 19 : photo microscopique d' <i>E. coli</i> avant (a) et après (b) l'irradiation par MO (x100).	p. 22
Figure 20 : courbes d'évolution temporelle de l'inactivation des souches <i>S. aureus</i> par irradiation MO	p. 23

Liste des figures

- Figure 21** : microphotographie électronique à balayage de cellules bactériennes (*E. coli*) non traitées et radiées par MO p. 24
- Figure 22** : image MEB pour *S. aureus* témoin (à droite) et après traitement par micro-ondes (à gauche) x10000. p. 24
- Figure 23** : diagramme des fuites d'ions intracellulaires (Ca^{2+} et K^+), d'ADN et de protéines provenant de cellules *E. coli* exposées à une irradiation MO p. 25
- Figure 24** : l'intensité fluorescente de *S. aureus* déterminé par Fluo-3/AM après traitement aux MO p. 26
- Figure 25** : résultat d'électrophorèse sur gel d'ADN génomique isolé à partir de coliformes fécaux prétraités par micro-ondes et chauffage externe p. 26
- Figure 26** : résultats de l'activité de β - galactosidase des coliformes fécaux traités par micro-ondes et chauffage externe p. 30
- Figure 27** : effet de différentes puissances de micro-ondes sur le nombre d'*E. coli* et *S. aureus* viables p. 30
- Figure 28** : photo d'une courbe du changement du comptage viable de cellules bactériennes irradiées (*S. aureus*, *E. coli*) p. 31
- Figure 29** : photo de changement dans la morphologie des souches bactériennes de *S. aureus* (à gauche) et *E. coli* (à droite) suite à une irradiation pendant 2,5 min à la puissance 300 W (x10000). p. 31
- Figure 30** : photo de changement dans la morphologie des souches bactériennes. *S. aureus* (à gauche) et *E. coli* (à droite) suite à une irradiation pendant 2,5 min à la puissance 1000 W (x10000). p. 32
- Figure 31** : données expérimentales et résultats de simulation de modèles pour *E. coli* irradiée à différentes puissances. p. 32
- Figure 32** : performance d'inactivation d'*E. coli* en suspension dans l'air et dans l'eau. p. 34
- Figure 33** : courbes de l'effet des concentrations de NaCl (a) et de KCl (b) sur les taux d'inactivation d'*E. coli* et sur la température finale obtenue par irradiation aux MO p. 35

Liste des tableaux

Tableau 01 : matériel utilisé dans l'étude	p. 05
Tableau 02 : concentrations d'ADN et ratio DO 260/280	p. 27
Tableau 03 : effets des microondes sur les activités enzymatiques chez <i>S. aureus</i>	p. 28
Tableau 04 : l'effet d'irradiation au MO sur l'activité de thermonucléase de <i>S. aureus</i>	p. 29

Liste des abréviations

ADN : Acide-Désoxyribose nucléique	(complexe oxoglutarate déshydrogénase)
ARN : Acide Ribonucléique	ONPG : <i>o</i> -nitrophényl- β -D galactopyranoside
ATP : Adénosine Triphosphate	PD : Power Density (densité de la puissance)
β-gal : β -galactosidase	RF : Radio Fréquences
CFU : Colony Forming Unit (unité formant colonies)	RLB : Reporter Lysis Buffer (reporteur de tampon de lyse)
TAS : Taux d'absorption spécifique	TAE : Tris base, Acide acétique, Ethylène-diamine-tétra acétate
DO : Densité optique	
EDTA : Ethylène-Diamine- Tétra Acétate	
G6PD : La glucose-6-phosphate déshydrogénase	
LB : Luria-Bertani	
LDH : Lactate Déshydrogénase	
MDH : Malate Déshydrogénase	
MEB : Microscope Electronique à Balayage	
MO : Microondes	
OGDC : Oxoglutarate Dehydrogenase Complex	

Introduction

Introduction

Tandis que les micro-ondes sont utilisées dans différentes applications, en de nombreux domaines de la vie, comme dans le domaine de médecine (l'hyperthermie micro-ondes est étudiée pour le traitement des tumeurs cancéreuses), chauffage industriel et domestiques (four à micro-ondes : la fréquence utilisée est de 2450 MHz), radio astronomie, électronique, radiométrie micro-onde, radio navigation, accélération des particules et dans des recherches physiques. Ces ondes électromagnétiques dont la gamme de fréquence comprise entre 300 MHz et 300 GHz [1], et d'une longueur d'onde de 1 m à 1 mm, sont actives de manière indirecte sur les microorganismes. Elles provoquent l'agitation thermique des molécules polaires et en particulier de l'eau. L'élévation de température qui en résulte (et qui concerne l'eau intracellulaire) entraîne la mort des micro-organismes : les formes végétatives sont beaucoup plus sensibles que les formes sporulées [2].

Les microorganismes jouent un rôle bénéfique important dans la nature, chez les êtres vivants et jusque dans notre vie quotidienne. Ils existaient dès les premiers temps de l'histoire de notre planète, ils sont des éléments indispensables à la vie [3]. Les bactéries, qui sont signalées il y a environ 3,8 milliards d'années [4], scindent en deux grand groupes par leur type de la paroi cellulaire, des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif,

Escherichia coli ou *E. coli* qui a été découverte par Theodor Escherich en 1885 [5], est une entérobactérie à Gram négatif et un élément important dans la flore intestinale humaine et de nombreux animaux, il représente environ 1% des micro-organismes. Partout, on trouve des variantes pathogènes et des variantes commensales, ces dernières étant bien plus fréquentes [6]. Les *staphylococcus aureus* qui sont des cocci à Gram positif, décrits en 1884 par Rosenbach après qu'il obtient des cultures pures des staphylocoques qui ont été découverts par Louis Pasteur en 1880 [7]. Les staphylocoques sont normalement associés à la peau, aux glandes cutanées et aux muqueuses des animaux à sang chaud [8]. *S. aureus* est le staphylocoque pathogène le plus important chez l'homme. Elle comprend en réalité 2 sous espèces, la sous espèce *S. aureus* subsp. *anaerobius* et *S. aureus* subsp. *aureus* [9].

E. coli et *S. aureus* sont responsables des infections variées en milieu communautaire et hospitalier [10], [11], leur présence dans les eaux et les aliments est un signe de contamination, pour cette raison, plusieurs techniques ont été développées dans le but de détruire ou d'inhiber ces micro-organismes et leurs toxines. Il s'agit des méthodes de traitement thermique (pasteurisation...) et athermique (utilisation des produits chimiques, fumigation etc.). Cependant, ces traitements altèrent parfois les produits sur lesquels ils sont utilisés et présentent un danger pour l'homme et l'environnement ; par conséquent, il est indispensable de chercher

Introduction

des techniques de traitement alternatives qui détruisent les micro-organismes et qui soient sans conséquences négatives sur l'environnement et la santé humaine [12].

Cette étude est une synthèse des travaux réalisés sur les effets biologiques des microondes à la fréquence 2,45 GHz sur *E. coli* et *S. aureus* et la possibilité d'utiliser ces ondes comme une technologie de décontamination.

Chapitre I

Matériel et méthodes

Chapitre I : Matériel et méthodes

Dans la première partie, qui concerne le « matériel » de ce chapitre, on va parler premièrement, sur le matériel biologique qui concerne les souches *E. coli* et *S. aureus*. Ensuite, sur le matériel d'irradiation microondes, ainsi d'autre matériel utilisé pour cette étude.

Et pour la deuxième partie « méthodes », les tests de confirmation des souches choisies seront détaillés, leurs méthodes de préparation pour l'irradiation et leur exposition aux microondes à la fréquence 2,45 GHz, à différentes puissances et différentes durées d'exposition, tirées à partir de différentes références bibliographiques qui traitent le sujet d'effets biologiques des microondes sur les bactéries *E. coli* et *S. aureus*.

I-1 MATERIEL

I-1-1 Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées sont *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

I-1-2 Matériel d'irradiation

Les micro-ondes et les radiofréquences (RF) sont respectivement produites au moyen de générateur résonant dans le domaine (klystrons ou magnétron) [13].

_ Les klystrons pour les puissances de 30 à 100 kW, sous des tensions de plus de 30 000 V. Plus coûteuse que les magnétrons, leur durée de vie est d'environ 10 000 heures ;

_ Les magnétrons pour les puissances de 0,6 à 6 kW, sous des tensions de 2 500 à 7 300 V. Leur durée de vie est de l'ordre de 4 000 heures. Le rôle du magnétron est de produire une tension électrique alternative à la fréquence de 2 450 MHz servant à alimenter une antenne [15].

I-1-2.1 Klystrons

Le klystron est en réalité est un énorme tube à vide linéaire entouré de cavités résonantes. Les électrons sont produits par un filament chauffé, et sont accélérés dans une section contenant deux grilles. Ces deux grilles sont liées à une source de tension alternative, qui rend possible une alternance de la charge : lorsqu'une grille est positive, l'autre devient négative. L'électron sera dès lors soit accéléré par une grille positive, soit décéléré si la grille est négative. On obtient donc un nuage électronique plus « dense » localement. Après avoir été modulé, le flot d'électrons passe dans la section centrale, qui contient des cavités résonantes, puis est collecté sur une électrode séparée. Une cavité résonante (resonant cavity) est un dispositif à l'intérieur duquel de l'énergie électromagnétique peut être stockée sous forme d'ondes stationnaires. On crée un champ radiofréquence dans la première cavité, ce qui va influencer le flux d'électrons

Chapitre I : Matériel et méthodes

[14]. Chaque cavité peut en effet se voir comme le système à deux grilles dont nous avons parlé. Dès lors, le champ va moduler le flux électronique par son alternance, et un champ amplifié sera créé dans la cavité suivante, calibrée afin d'obtenir cet effet [14].

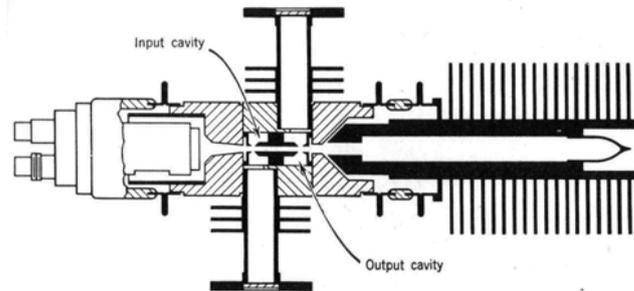


Figure 01 : klystron à deux cavités utilisé dans les années 50 [14]

I-1-2.2 Magnétron

Le magnétron peut se voir comme le véritable « cœur » du four à micro-ondes. Il s'agit en effet du moyen de production par excellence de ces ondes. Le magnétron se compose d'un cylindre creux, fermé par deux aimants permanents ou électro-aimants. A l'intérieur du cylindre, on distingue la cathode, constituée d'un filament hélicoïdal en tungstène, de l'anode, qui comprend plusieurs cavités résonantes. Ces cavités peuvent présenter diverses formes. L'espace (quelques millimètres) entre la cathode et l'anode servant d'espace d'interaction, il y règne un vide très poussé. Le bloc de l'anode est muni d'un système de refroidissement par ailettes ou par circulation d'eau [14].



Figure 02 : Schéma d'un magnétron (N : nord de magnétron (anode), S : sud de magnétron (cathode)) [14]

Le magnétron fait intervenir deux types « d'influences » : celle du champ magnétique, produit par les aimants, et celle du champ électrique, entre l'anode et la cathode. C'est pour cela que l'on appelle parfois le magnétron tube à champs croisés. On applique entre l'anode et la cathode une tension très élevée (de l'ordre de quelques kilovolts), pour un espace très restreint (quelques millimètres). Les électrons qui quittent la cathode sont accélérés par le champ

Chapitre I : Matériel et méthodes

continu, et, en l'absence de champ magnétique, ils suivraient une trajectoire radiale pour rejoindre l'anode, mais le champ magnétique incurve ces trajectoires, et les électrons décrivent une spirale [14].

I-1-3 Autre matériel

Le tableau suivant représente le matériel utilisé dans l'étude.

Tableau 01 : matériel utilisé pour l'étude

Verreries	Appareillage	Produits	Autre matériel
<ul style="list-style-type: none"> _ Tubes à essai _ Erlenmeyers _ Bêchers _ Boites Pétri _ Pipettes Pasteur _ Eprouvettes _ Flacons Nephelo 	<ul style="list-style-type: none"> _ Incubateur _ Spectrophotomètre _ Microscope optique _ Centrifugeuse _ Etuve _ Agitateur magnétique thermique _ Détecteur photosensible _ Presse cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> _ Tampon phosphate _ Violet de gentiane _ Lugol _ Ethanol _ La fuchsine _ Solution de NaCl _ Solution d'agarose _ Huile à immersion _ Tampon de cacodylate de sodium_ glutaraldéhyde _ Bromure d'éthidium _ Les sels de tétrazolium _ Bleu de toluidine 	<ul style="list-style-type: none"> _ Anse de platine _ Bec Bunsen _ Bouillon LB _ Bouillon nutritif _ Eau distillée

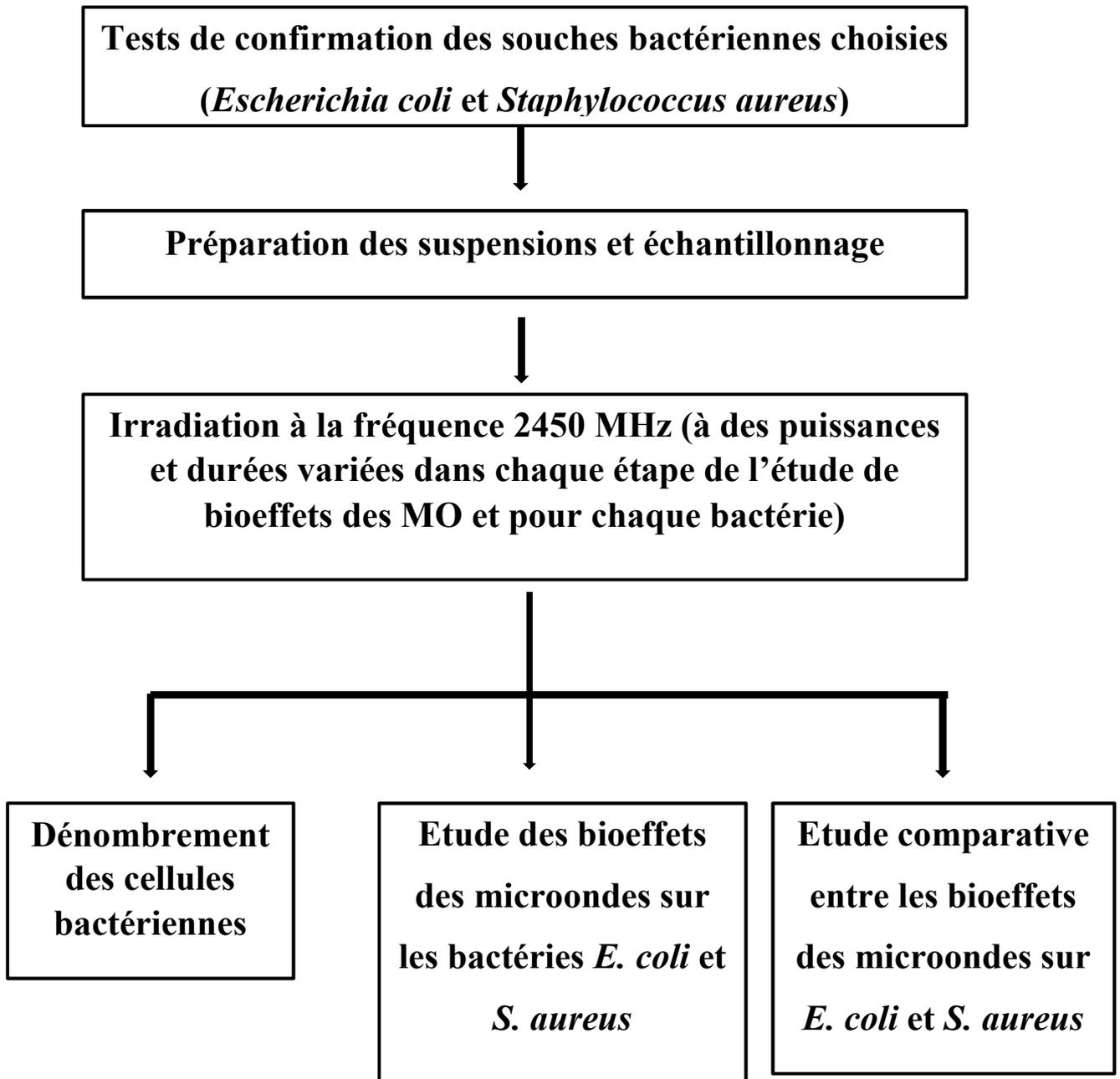


Figure 03 : schéma du protocole expérimental

Chapitre I : Matériel et méthodes

I-2 METHODES

Dans notre étude sur les effets biologiques des microondes sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, et en raison de l'impossibilité d'accès aux laboratoires à cause de la pandémie covid-19, nous avons collecté diverses informations liées à ce sujet à partir de plusieurs sources (ouvrages, articles, revues, mémoires, etc.) qui correspondent à des traitements et à la décontamination par micro-ondes, puis nous avons trié ces informations selon la méthodologie standard d'un mémoire de master.

I-2-1 Tests de confirmation des souches bactériennes choisies

I-2-1.1 Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique permet d'observer les colonies dans des milieux de cultures appropriés pour chaque bactérie.

a. *E. coli*

Milieu Mac-Conkey est un milieu recommandé pour isoler et numérer les entérobactéries dans les eaux, le lait, les matières alimentaires, les urines... [16].

La lecture des cellules ensemencées dans ce milieu est faite après 18 à 24 heures d'incubation à 37° C : les colonies lactose – sont incolores, les colonies lactose + rouge brique, entourées d'un halo opaque de sels biliaires précipités [16].

b. *S. aureus*

Le milieu Chapman : la forte teneur en NaCl ne permet que la multiplication de *Staphylococcus* (et quelques rares autres bactéries : *Streptococcus D*, *Bacillus*). Leurs colonies présentent leur aspect habituel, mais la pigmentation n'est pas très apparente ;

Les staphylocoques pathogènes fermentent le mannitol et acidifient le milieu qui vire au jaune. Sur une boîte de Pétri, la coloration reste localisée autour des colonies. Les staphylocoques non pathogènes ne modifient pas la teinte originelle de milieu de Chapman, qui reste rouge [19].

I-2-1.2 Aspect microscopique

a. L'examen à l'état frais

L'examen à l'état frais permet l'observation des bactéries vivantes en absence de toute fixation ou coloration. Cette méthode permet d'observer, la morphologie des bactéries, leur mode de groupement, et leur motilité [17].

Technique

Prélèvement : à partir de cultures en milieux liquides ou solides.

Chapitre I : Matériel et méthodes

_ à partir de culture en milieu liquide : une goutte de culture est prélevée à la pipette Pasteur remplie par capillarité ou à l'anse de platine avec les précautions de stérilité habituelles, et déposée au milieu d'une lame propre. On pose ensuite délicatement la lamelle, bien orientée ; La goutte doit être suffisante mais proportionnée à la lamelle choisie. On répartit le liquide sous la lamelle en appuyant très légèrement avec l'extrémité d'une pince ou avec l'ongle ;

_ À partir de culture en milieu solide : l'examen doit être fait dans la mesure du possible à partir des cultures jeunes ;

On dépose au centre de la lame une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique, dans laquelle on dissocie une très petite quantité de culture prélevée au fil ou à l'anse. La lamelle est posée comme précédemment [16].

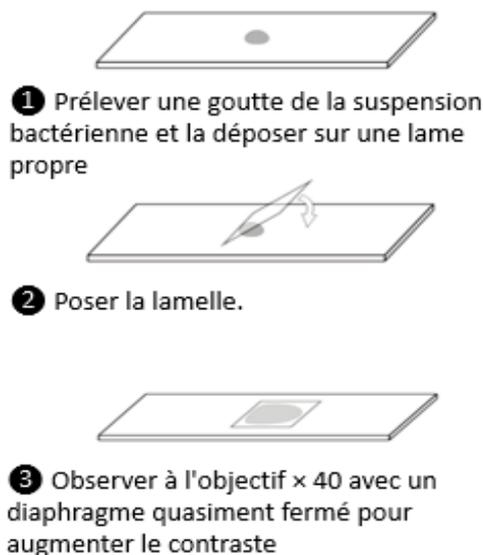


Figure 04 : schéma de technique de l'examen à l'état frais [63]

Observation : on pourra faire une première observation avec un objectif faible, mais on utilisera classiquement, soit l'objectif $\times 40$, soit l'objectif $\times 60$. Pour mettre en évidence certains détails de structure, l'objectif à immersion peut être utilisé [16].

b. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif, et les bactéries à Gram négatif [17].

Technique

-Recouvrir le frottis bactérien avec la solution de violet de gentiane. Laisser agir 1 min. Rincer doucement la lame inclinée avec de l'eau pendant quelques secondes ;

-Recouvrir la lame avec la solution de Lugol. Laisser agir 1 min. Rincer doucement la lame inclinée avec de l'eau pendant quelques secondes ;

Chapitre I : Matériel et méthodes

-Faire couler doucement et en continue un film d'éthanol sur la lame inclinée pendant 30 s à 1 min jusqu'à cessation de l'émission de couleur violette. Rincer doucement la lame inclinée avec de l'eau pour éliminer l'alcool [18].

-Recouvrir la lame avec la fuchsine pendant 30 s à 1 min [20]. Rincer doucement la lame inclinée avec de l'eau. Sécher la lame en épongeant délicatement la lame colorée entre deux feuilles de papier filtre fin ou papier joseph [18].

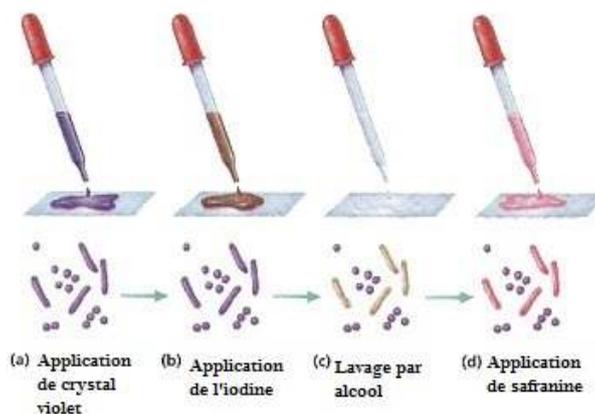


Figure 05 : schéma de la technique de coloration de Gram [64]

-Un examen à l'immersion n'est possible que si la lame est parfaitement sèche [18].

I-2-1.3 Caractères biochimiques

L'étude des caractères biochimiques est une étape permettant de confirmer la souche bactérienne.

a. *E. coli*

Galerie type (macro méthode) : Commune à l'étude de toutes les entérobactéries, elle comprend en bactériologie médicale ;

Le milieu glucose-lactose- H_2S (Kligler-Hajna) permet la mise en évidence de l'action sur le glucose, l'action sur lactose, la production de H_2S , et par des réactions enzymatiques complémentaires, la mise en évidence de beta galactosidase et de la lysine-décarboxylase [19]. Ce milieu solide en pente contient du glucose (0,1%), du lactose (1%), des acides aminés, du thiosulfate de sodium, du citrate ferrique et du rouge de phénol. Ce milieu estensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot estensemencé par piqûre centrale [20].

Les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot), le culot vire au jaune. Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par réalcalinisation du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés. Si les bactéries utilisent le lactose en aérobie relative (pente), il y a virage de la pente au jaune [20].

Chapitre I : Matériel et méthodes

Le milieu urée-indole contient du tryptophane, de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH. L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne, va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin, entraînant une coloration rose-rouge du milieu [20].

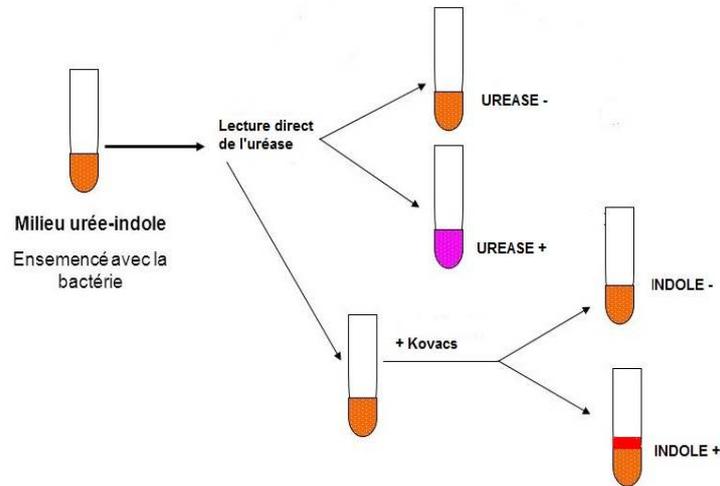


Figure 06 : schéma de la technique de recherche de l'indole et de l'urée [65]

Il permet la mise en évidence de production d'indole (par une formation d'anneau rouge sur la surface de tubes ensemencés) en présence de réactif Kovacs [19].

b. S. aureus

Test de catalase : deux méthodes classiques permettent de chercher cette enzyme :

Méthode 1 : prendre un tube à hémolyse contenant 1 ml d'eau physiologique stérile ;

émulsionner une quantité suffisante d'une culture bactérienne de 24 h prélevée sur milieu gélosé, afin d'obtenir une suspension épaisse (turbidité importante). Ajouter 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 3% sans agiter. Attendre 1 à 2 minutes avant d'observer [22].

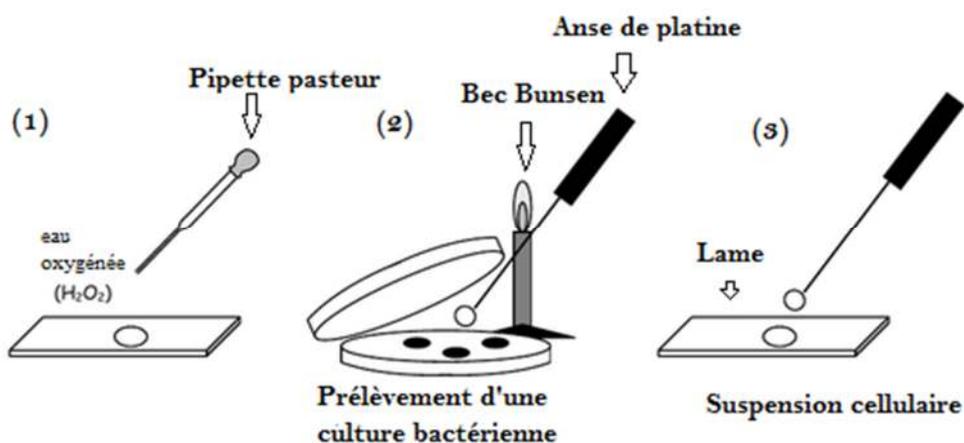


Figure 07 : schéma de la technique de test de catalase [66]

Méthode 2 : prendre une lame porte objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose [22].

Chapitre I : Matériel et méthodes

I-2-2 Préparation des suspensions bactériennes et échantillonnage

Pour une meilleure étude sur une bactérie spécifique, une mise en culture est nécessaire pour purifier cette culture d'une autre contamination et confirmer sa croissance dans des conditions favorables.

a. *E. coli*

Les souches *E. coli* sont inoculées dans un bouillon nutritif, ou bien dans un bouillon LB (1% de peptone, 0,5% d'extrait de levure et 1% de NaCl, pH 7,2), et cultivées dans un incubateur à 37 °C pendant 24 h à pH neutre, [23, 24, 25]. En suite la culture va être centrifugée puis lavée par une solution de NaCl à 0,9%, ou par tampon phosphate (pH 7,1) contenant 1 mmol. l⁻¹ MgSO₄, à fin de les mettre en suspension dans tampon phosphate [23, 25], ou directement diluée par eau distillée à certaines concentrations [23, 24].

b. *S. aureus*

Les bactéries *S. aureus* inoculées dans un bouillon nutritif, et cultivées dans un incubateur à 34 °C - 37 °C pendant 24 h à pH neutre [24, 26], ou inoculées dans un bouillon cœur-cerveille et mises pendant 18 h sur un agitateur rotatif à 37 °C, à fin que les cellules soient récoltées par centrifugation. Les culots cellulaires ont été remis en suspension et lavés par un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2. Les cellules purifiées ont ensuite été mises en suspension dans un volume minimum du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2 [27].

Echantillonnage

Des portions ont été extraites à partir des cultures mères des bactéries *E. coli* ou *S. aureus* (suspensions diluées par eau distillée, eau physiologique ou tampon phosphate) et transfusées dans des récipients appropriés (tubes à essai, erlenmeyers, béchers...), pour que les échantillons à irradier et ceux de témoin soient être répartis, afin de confirmer le changement porté par l'irradiation MO sur les bactéries (*E. coli* et *S. aureus*) [28, 26, 32].

I-2-3 Dénombrement des cellules bactériennes

Il existe de nombreuses méthodes de comptage des cellules bactériennes. Parmi ces techniques on cite la technique de mesure de la croissance par turbidimétrie, par spectrophotométrie ; On mesure l'état du trouble, ou turbidité, à l'aide d'un spectrophotomètre dans lequel un faisceau lumineux frappe une suspension bactérienne avant d'être transmis à un détecteur photosensible. Au fur et à mesure que le nombre de bactéries augmente, la quantité de lumière qui atteint le détecteur photosensible diminue. Cette variation est indiquée en pourcentage transmis sur la graduation de l'instrument, qui comprend aussi une expression logarithmique appelée absorbance ou densité optique (DO) ; l'instrument peut également donner une valeur

Chapitre I : Matériel et méthodes

dérivée du pourcentage de lumière transmise. On se sert de l'absorbance pour représenter graphiquement la croissance bactérienne. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance exponentielle ou en phase de déclin, la courbe de l'absorbance en fonction du temps est approximativement une droite [17].

L'estimation du nombre des cellules bactériennes est basée sur l'utilisation d'un spectrophotomètre à longueur d'onde égale à 600 nm [28].

Le dénombrement est réalisé avant et après l'irradiation aux MO.

I-2-4 Irradiation des souches *E. coli* et *S. aureus*

L'irradiation est l'action de soumettre un produit ou un matériel à un rayonnement [2].

Les échantillons préparés des souches bactériennes (*E. coli* et *S. aureus*) sont mis à l'irradiation MO à la fréquence de 2450 MHz (produite par générateur de microondes et/ou four à microondes). L'effet apporté par les microondes sur les deux bactéries *E. coli* et *S. aureus*, peut être analysé par une comparaison entre les souches de témoins et les souches irradiées.

I-2-5 Etude des bioeffets des microondes sur les bactéries *E. coli* et *S. aureus*

I-2-5.1 Bioeffets sur la paroi cellulaire (morphologie)

La détermination de changement de morphologie est basée sur l'observation microscopique des cellules bactériennes témoins et irradiées.

a. *E. coli*

Une suspension cellulaire est maintenue à 20 °C, et placée au centre du four et exposée aux micro-ondes (2450 MHz) à pleine puissance (600 W) ;

Après que les cellules aient été traitées par rayonnement MO, la forme des cellules a été examinée par microscopie électronique, après qu'ont été fixées à 24 °C pendant 60 min avec 2,5% de glutaraldéhyde dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,2), déshydratées avec une concentration en série d'éthanol, puis séchées. Les échantillons de cellules séchées ont été revêtus d'or et examinés en utilisant un microscope électronique à balayage [28].

b. *S. aureus*

Les bactéries *S. aureus* inoculées dans une solution peptone ont été traitées pendant 2,5 minutes, dans un four à MO, avec puissance de 1000 W, ensuite elles ont été observées par un microscope électronique à balayage (MEB) avant et après l'irradiation [29].

Chapitre I : Matériel et méthodes

I-2-5.2 Bioeffets sur la membrane plasmique

a. *E. coli*

L'acide nucléique et ses composés apparentés, tels que les pyrimidines et les purines, sont bien connus pour absorber la lumière UV à une longueur d'onde de 260 nm. La présence de ces matériaux dans une suspension indique des dommages à la cellule au niveau de la membrane. En outre, des cellules endommagées sont également connues pour libérer des protéines intracellulaires en suspension [28, 25].

b. *S. aureus*

S. aureus est mise dans un bouillon nutritif, cultivée à 37 °C pendant 48 heures, irradiée à la puissance 900 W, pendant 100 s [30].

A partir d'une solution mère traitée aux microondes, un échantillon de 1 ml est centrifugé et lavé à fin d'ajouter une certaine concentration de Fluo-3/AM et incubé à 37 °C pendant 30 min à l'obscurité. La solution ainsi obtenue est centrifugée pour éliminer le surnageant, et lavée puis mise en suspension dans une solution physiologique saline. L'observation est faite à 408 nm par spectroscopie de fluorescence (longueur d'onde d'observation pour surveiller les changements de calcium intracellulaire) [30].

I-2-5.3 Bioeffets sur l'ADN

L'électrophorèse sur gel est une technique qui permet la séparation des molécules d'ADN (simple brin, double brin et super enroulé) et d'acide ribonucléique (ARN) en fonction de leur taille [32].

_ l'ADN génomique est isolé à partir de coliformes fécaux par le protocole Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit ®, et purifié par le manuel technique de Promega Corp adopté sans modification [32].

_ Une solution chaude d'agarose est préparée par le dissout de l'agarose (1,4 % p/v) dans un tampon TAE (40 mM tris base, 40 mM d'acide acétique, 1 mM d'éthylène-diamine-tétra acétate (EDTA)) ;

_ Après refroidissement de la solution homogène à 50 °C, une solution de bromure d'éthidium (10 mg/ml) a été ajoutée en donnant une concentration finale de colorant de 0,5 µg/ml, puis laissée refroidir dans la température ambiante ;

_ La solution d'agarose fondue a été versée dans des tubes en verre (10 x 0,6 cm i.d : diamètre interne) ;

_ Les gels ont été traités par un tampon contenant 0,5 mg / ml de bromure d'éthidium [31].

Chapitre I : Matériel et méthodes

_ Les échantillons ont été ajustés à 8% de saccharose et 0,025% de bleu de Bromophénol avant le chargement sur les gels. L'électrophorèse a été effectuée pendant 2 heures à 5 mA / gel à température ambiante. Les gels sont ensuite visualisés avec une lumière ultraviolette (UV) [31].

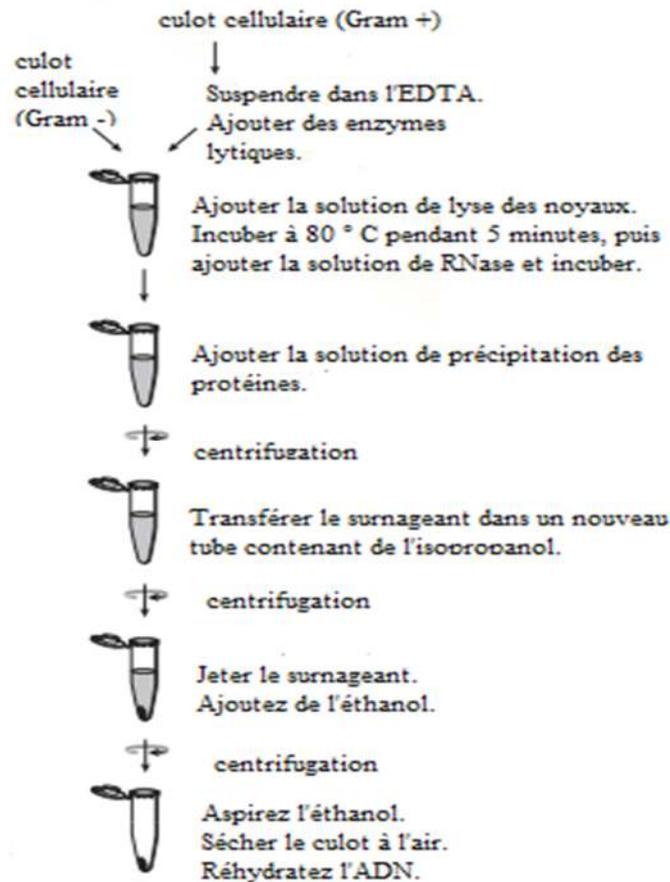


Figure 08 : protocole de Wizard Genomic DNA Purification Kit ® [67]

L'ADN a été quantifié avec un spectrophotomètre UV à 260 et 280 nm. L'absorbance des échantillons d'ADN à A280 (A : Absorption) indique la concentration des protéines et des acides nucléiques. Le rapport A260 / A280 représente la pureté de l'échantillon d'ADN. En règle générale, A260 / A280 doit se situer entre 1,75 et 2 pour un ADN de bonne qualité sans protéines ni autres acides nucléiques [32].

Chapitre I : Matériel et méthodes

I-2-5.4 Bioeffets sur certains caractères biochimiques

Pour savoir l'effet porté par les MO sur l'activité métabolique de *S. aureus*, le protocole suivant a été décrit :

_ 50 ml des suspensions de *S. aureus* ont été transférées dans des flacons Nephelo de 500 ml et diluées avec 150 ml de bouillon nutritif. Les cultures ont ensuite été soit immédiatement centrifugées (témoin), soit irradiées pendant plusieurs temps et centrifugées. Les cultures de test en flacons ont été exposées à un rayonnement MO (2450 MHz) pendant 10, 20, 30 et 40 s [26].

Les cellules de témoin et irradiées, ont été remises en suspension dans un maximum de 5 ml d'eau distillée et ont été passées sous une presse cellulaire puis centrifugées plusieurs fois, ensuite le surnageant est centrifugé encore une fois pour séparer les fragments de membrane cellulaire et des lysats cellulaires ;

Des dosages ont été effectués pour les enzymes suivantes : lactate déshydrogénase (LDH), une cétooglutarate déshydrogénase (OGDC), et malate déshydrogénase (MDH). La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), cytochrome oxydase, phosphatase alcaline, et adénosine triphosphatase (ATPase). Des tests d'activité enzymatique ont été réalisés à partir des membranes et des lysats des cellules exposées à 20 s de rayonnement MO, car il a été observé qu'une amélioration significative ($P < 0,01$) du nombre de cellules se produisait après 20 s de rayonnement lorsque les cultures étaient cultivées dans un bouillon nutritif ;

Pour la détermination de l'activité thermonucléase (DNase) des tests ont été faits comme suit, une quantité de 9 ml de la gélose au bleu de toluidine acide *O*-désoxyribonucléique a été placée dans une boîte de Pétri et laissée se solidifier. Les souches *S. aureus* ont été cultivées comme décrit ci-dessus. Des échantillons de 2 ml ont été prélevés avant le rayonnement, puis les flacons ont été irradiés comme décrit ci-dessus. Des échantillons de 2 ml de flacons irradiés ont ensuite été prélevés toutes les 0,5 h pendant 3 h. Tous les échantillons ont été placés dans un bain d'eau bouillante pendant 10 min, et des portions de 2 μ l des échantillons bouillis ont été prélevés et placés dans des puits (1 mm de large ; réalisés avec une pipette Pasteur) dans la gélose à l'acide *O*-désoxyribonucléique au bleu de toluidine. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 4 h à 37 °C et examinées pour la présence de zones roses entourant les cellules [26].

Autre étude de HONG S.M et *al*, sur l'effet de MO sur l'activité de l'enzyme β -galactosidase (β -gal), un test de « β -Galactosidase Enzyme Assay System avec Reporter Lysis Buffer (RLB) » est réalisé, une méthode appropriée pour doser l'activité de la β -gal dans les lysats préparés à partir de cellules transfectées avec le vecteur reporteur de β -gal. Le dosage standard est effectué

Chapitre I : Matériel et méthodes

en ajoutant un échantillon à un volume égal de Assay 2 x Buffer, qui contient le substrat *o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG) [32].

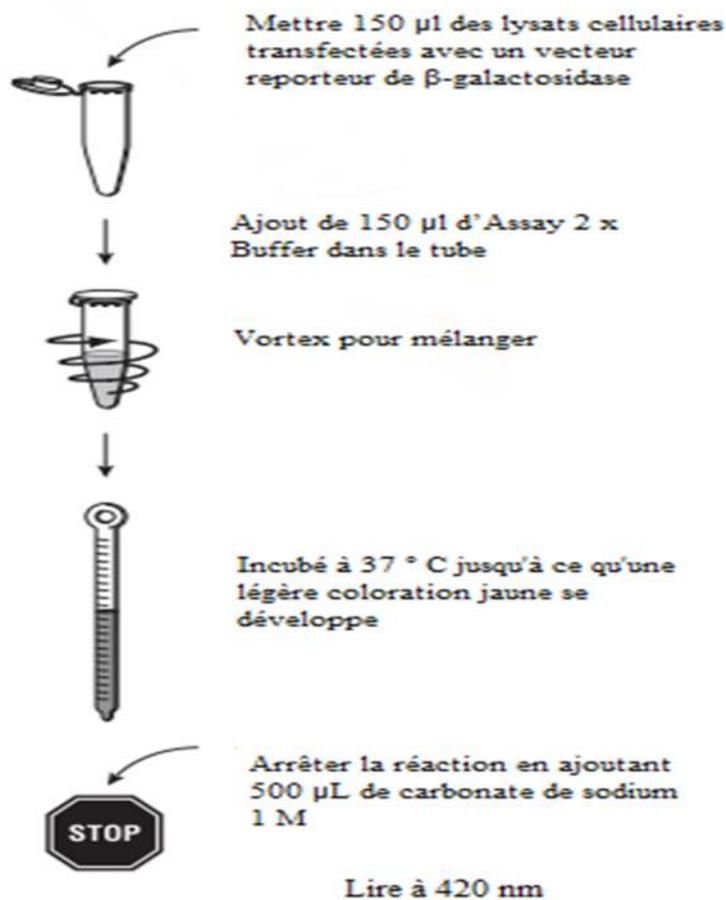


Figure 09 : schéma de technique d'étude de l'activité de β -galactosidase chez les coliformes fécaux [68]

Les échantillons sont incubés pendant 30 min, période pendant laquelle la β -gal hydrolyse le substrat incolore en *o*-nitrophénol, qui est jaune. La réaction est terminée par l'addition de carbonate de sodium et l'absorbance est lue à 420 nm avec un spectrophotomètre. Dans cette étude, un dosage enzymatique de la β -gal a été réalisé pour mesurer l'activité enzymatique des coliformes fécaux prétraités par micro-ondes [32].

I-2-6 Études comparatives entre les bioeffets des MO sur *E. coli* et *S. aureus*

A ce qui a été exposé ci-dessus (dénombrement des cellules bactériennes), on ajoute dans ce qui suit deux études comparatives relatives à l'effet de l'irradiation microondes sur les deux bactéries d'étude.

Chapitre I : Matériel et méthodes

E. coli et *S. aureus* purifiées, ont été incubées à 37 °C pendant 24 h dans un bouillon nutritif à pH neutre. Des dilutions en série ont été préparées dans 9 ml de solution saline stérile à 0,85% (p / v) (poid /volume) et la densité finale a été ajustée à 0,5 MacFarland. L'expérience a été réalisée, aux différentes puissances (90, 360 et 900 W) et en différentes durées pour déterminer l'effet du rayonnement MO, en réalisant des méthodes de comptage de colonies. Après des dilutions en série, les bactéries dans la solution saline stérile ont été étalées sur une plaque de gélose standard (gélose nutritive). Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h et les colonies ont été comptées après la période d'incubation. De plus, des échantillons non traités ont été utilisés comme groupe témoin de chacun des micro-organismes testés [24].

Des cellules *E. coli* et *S. aureus* sont irradiées aux mêmes conditions (puissance 300 W et 1000 W pendant 2,5 min puis observées par un MEB a un grossissement x10000, pour comparer l'effet des MO sur la morphologie de ces deux souches [29].

Chapitre II

Résultats et discussion

Chapitre II : Résultats et discussion

Dans ce chapitre, la première partie « résultats » permet de montrer les résultats de confirmation des souches bactériennes (*E. coli* et *S. aureus*), et de déterminer les bioeffets des MO sur ces souches, qui correspond aux différentes étapes méthodologiques illustrées dans la deuxième partie de premier chapitre « matériel et méthodes ».

La deuxième section de ce chapitre « discussion » est consacrée pour une analyse et interprétation des résultats des recherches antérieures.

II-1 RESULTATS

II-1-1 Confirmation des souches bactériennes choisies

II-1-1.1 Aspect macroscopique

a. *E. coli*

La figure 10 montre les colonies d'*E. coli* sur le milieu Mac-Conkey, cultivée pendant 18 h à 37 °C [21].



Figure 10 : photo des colonies d'*E. coli* sur un milieu de MacConkey [69]

E. coli se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux géloses en donnant de colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées [7]. Sa croissance optimale est à pH 5,5 – 8 et une température optimale est de 20 à 45 °C [33].

b. *S. aureus*

Les colonies de *S. aureus* développées après 24 heures 37 °C d'incubation sur le milieu Chapman [21].



Figure 11 : photo des colonies de *S. aureus* sur une gélose de Chapman [70]

Culture sur gélose hypersalée au mannitol, montrant des colonies jaunes [21]. Cette coloration a d'ailleurs donné le nom d'« aureus » à *S. aureus* car la pigmentation est souvent de couleur or (jaune à jaune orangée) [34].

Chapitre II : Résultats et discussion

II-1-1.2 Aspect microscopique

a. A l'état frais

- *E. coli*

Une bactérie fine et allongée à extrémité arrondie, mobile grâce à une ciliature péritriche [36].

- *S. aureus*

Non-mobiles, se produisent séparément et forment des paires et des grappes [37].

b. Coloration de Gram

- *E. coli*

La figure ci-dessous présente la photo des bactéries *E. coli* après coloration de Gram.



Figure 12 : photo d'*Escherichia coli* après coloration de Gram, (x 500) [38]

E. coli après coloration de Gram donne une coloration rose due au type de la paroi cellulaire Gram négatif [35].

- *S. aureus*

La figure ci-dessous présente une photo des bactéries *S. aureus* après coloration de Gram.

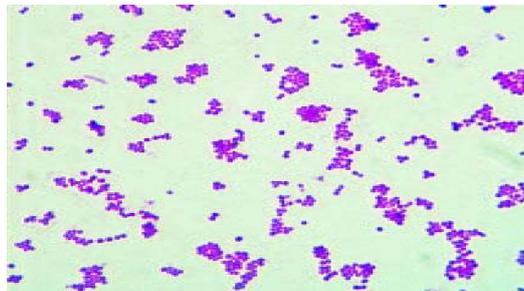


Figure 13 : photo des *S. aureus* après la coloration de Gram, (x 1500) [38]

Les souches de *S. aureus* après coloration de Gram donnent une couleur mauve due au type de la paroi cellulaire Gram positif.

Chapitre II : Résultats et discussion

II-1-1.3 Caractères biochimiques

a. *E. coli*

Résultats d'incubation des *E. coli* dans le milieu glucose-lactose-H₂S (Kligler-Hajna)

La photo suivante présente le résultat d'incubation des *E. coli* dans un milieu de Kligler-Hajna.

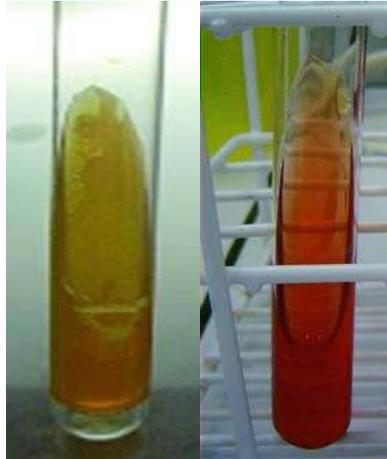


Figure 14 : photo des résultats d'incubation des *E. coli* dans le milieu de Kligler-Hajna (à la gauche), le milieu Kligler-Hajna non ensemencé (à droite) [20]

Les résultats montrent une pente vire au jaune due à une acidification du glucose, et aucune coloration en noire qui résulte de la production de H₂S. Alors *E. coli* est une bactérie qui possède les caractères suivants : H₂S -, glucose +, lactose +, et productrice de gaz [20].

Résultats d'incubation du milieu urée-indole

La recherche de l'uréase de souche *E. coli* est réalisée par l'inoculation de la souche dans un milieu urée-indole donne et le résultat est le suivant.



Figure 15 : photo des résultats d'incubation d'*E. coli* dans le milieu urée-indole [21]

L'urée : culture sur gélose une suspension dense de bactéries *E. coli* en urée-indole, étuve à 37 °C. La couleur de milieu reste jaune [21], l'uréase est donc négative [35].

Chapitre II : Résultats et discussion

L'indole : la recherche de production d'indole de souche *E. coli* dans le milieu urée-indole donne le résultat ci-dessous.



Figure 16 : photo des résultats d'incubation d'*E. coli* dans le milieu urée-indole + kovacs (a), le milieu urée-indole + kovacs non inoculée (b) [21]

La figure ci-dessus montre un anneau en surface, de couleur rouge dans le tube qui été inoculé avec la souche *E. coli*, due à la présence d'indole [19].

b. *S. aureus*

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir de H_2O_2 une libération d'oxygène gazeux selon la réaction : H_2O_2 donne $H_2O + \frac{1}{2} O_2$ [20].

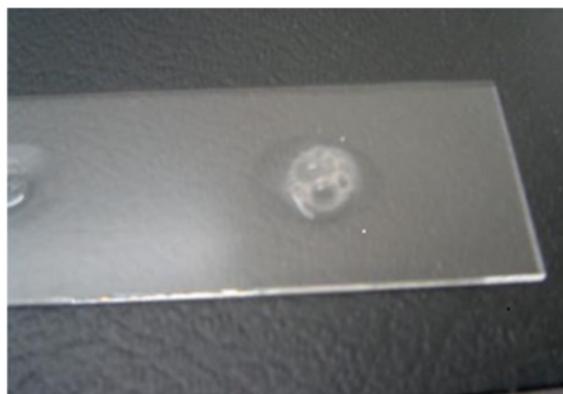


Figure 17 : photo d'une réaction de catalase produite en présence *S. aureus* [20]
Un dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase chez *S. aureus* [22].

Chapitre II : Résultats et discussion

II-1-2 Dénombrement des cellules bactériennes

a- *E. coli*

Les culots cellulaires remis en suspension dans une solution de NaCl à 0,9% à une concentration cellulaire de 10^9 à 10^{10} CFU / ml, et irradiés à la puissance 600 W pendant 80 s donne les résultats ci-dessous [28].

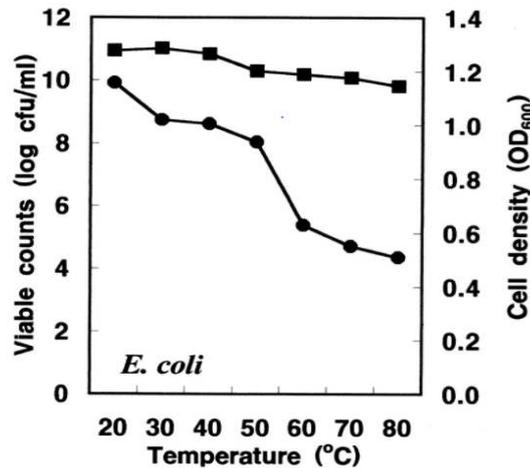


Figure 18 : modification du nombre des cellules viables et de la densité cellulaire dans les suspensions d'*E. coli*, par rapport à la température produite par le rayonnement MO, ● : dénombrement cellulaire viable ; ■ : densité cellulaire [28]

La figure 18 montre que les comptes viables et la densité dans la suspension cellulaire irradiée à 2450 MHz, diminuaient considérablement de nombre initiale $10^9 - 10^{10}$ CFU / ml à environ de 5 log, et de D₀₆₀₀ initiale 1,18 à environ 0,5, et tous par rapport à une augmentation des températures de 20 °C à 80 °C [28].



Figure 19 : photo d'*E. coli* avant (a) et après (b) l'irradiation par MO (x100) [24]

La figure 19 représente des photos microscopiques des cellules *E. coli* (colorées avec du cristal violet pendant 1 min) prises à un grossissement de 1000 par un microscope optique. La figure

Chapitre II : Résultats et discussion

19a correspond à la référence (non traitée) tandis que la figure 19b correspond aux cellules traitées aux micro-ondes.

Après l'irradiation des cellules bactériennes *E. coli* inoculées dans une gélose nutritive en utilisant de 0,5 à 2 MacFarland, à la puissance 900 W pendant 60 s, une diminution dans le nombre des cellules viables est apparue de façon remarquable dans la figure 19 [24].

b- *S. aureus*

Le résultat d'irradiation à 2450 MHz pendant 50 s, des souches *S. aureus* suspendues dans un tampon phosphate, se montre dans la courbe ci-dessous.

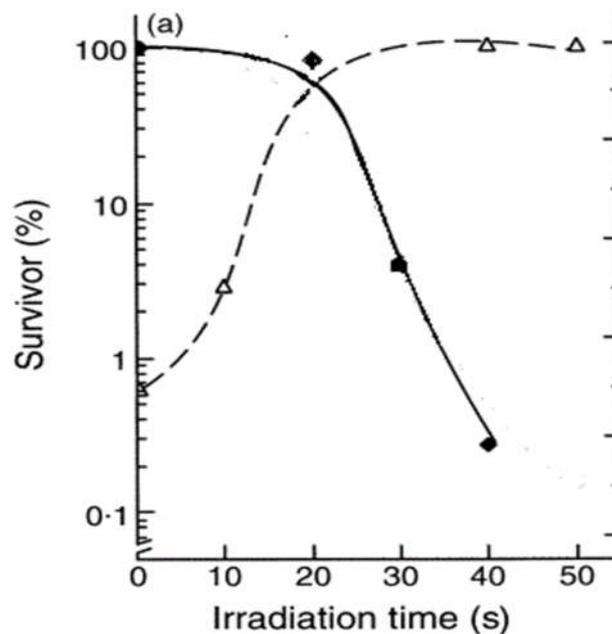


Figure 20 : courbes d'évolution temporelle de l'inactivation des souches *S. aureus* par irradiation MO. Le nombre des cellules survivantes (lignes pleines) et les températures de point final (lignes pointillées) [25]

Le nombre viable des cellules *S. aureus* irradiées a diminué à presque 0,1% avec l'augmentation de la température (100 °C) après 50 s [25].

Donc les figures 18, 19, 20 montrent que les cellules *E. coli* et *S. aureus* ont été inactivées par irradiation MO à 2450 MHz pendant 80, 60, 50 s respectivement, et que la chaleur générée a été considérée comme étant principalement responsable de l'inactivation cellulaire [24, 25, 28].

II-1-3 Bioeffets des MO sur les bactéries *E. coli* et *S. aureus*

II-1-3.1 Bioeffets sur la paroi cellulaire (morphologie)

a. *E. coli*

Après que les cellules aient été traitées par rayonnement micro-ondes, la forme des cellules a été examinée par microscopie électronique. Les cellules ont été fixées à 24 °C pendant 60 min.

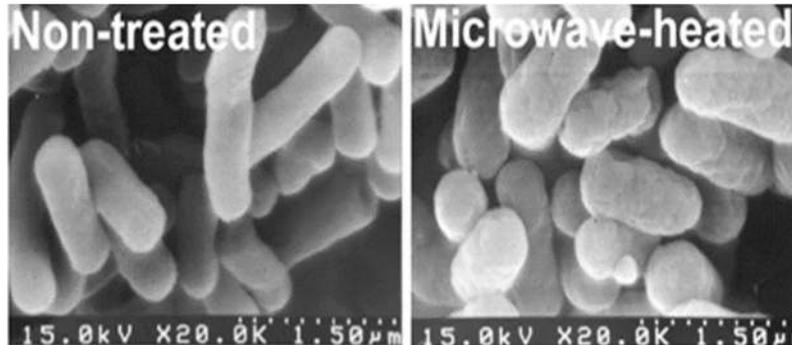


Figure 21 : microphotographie électronique à balayage de cellules bactériennes (*E. coli*) non traitées et radiées par MO (jusqu'à 70 °C) à 600 W [28]

Les cellules non traitées et les cellules chauffées à 70 °C ont été examinées à l'aide d'un microscope électronique à balayage, et les formes de leurs structures de surface ont été comparées. Il a été constaté que les cellules *E. coli* non traitées avaient une surface lisse, tandis que la plupart des cellules rayonnées par MO présentaient une destruction sévère, les surfaces des cellules chauffées aux MO étaient endommagées et étaient devenues rugueuses et gonflées [28].

b. *S. aureus*

Après l'irradiation des souches *S. aureus*, à 2450 MHz et la puissance 1000 W, pendant 2,5 min, l'image MEB ci-dessous a été obtenue.

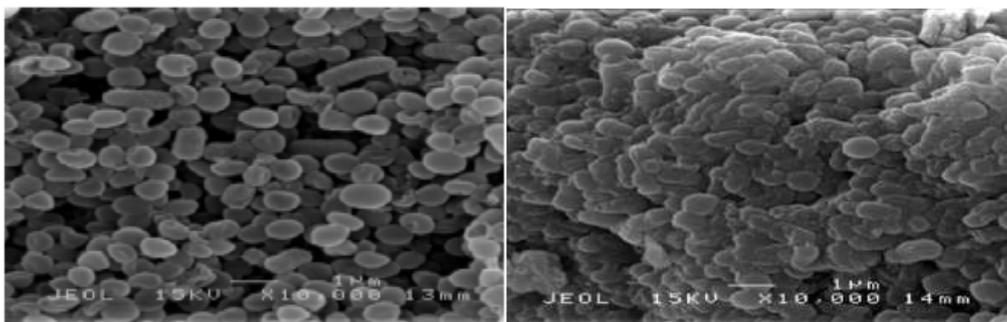


Figure 22 : image MEB pour *S. aureus* témoin (à droite) et après traitement par micro-ondes (à gauche) x10000 [29]

On observe clairement que l'apparence des bactéries *S. aureus* traitées est influencée par l'irradiation aux MO, en portant des changements dans la morphologie cellulaire [29].

Chapitre II : Résultats et discussion

Les résultats suggèrent que les cellules radiées par MO sont restées non lysées en suspension, bien qu'elles aient été inactivées par le rayonnement. En outre, les dommages à la structure de surface des cellules d'*E. coli* ne peuvent pas donc être la principale raison de l'inactivation par chauffage par micro-ondes [28, 29].

II-1-3.2 Bioeffets sur la membrane plasmique

a. *E. coli*

Les échantillons d'*E. coli* sont inoculés dans un bouillon nutritif, irradiés à 2450 MHz, et à 119 – 700 W durant 20 min. Les mesures des DO₂₆₀ des solutions sont illustrées dans le diagramme ci-dessous [23].

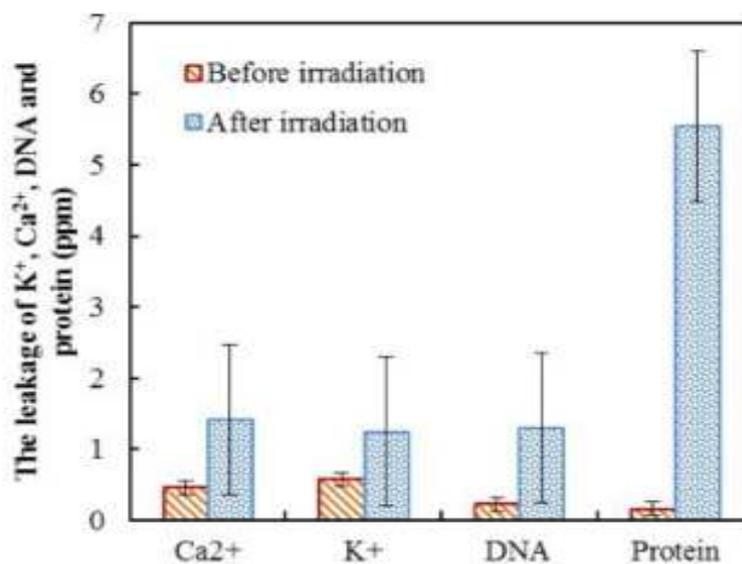


Figure 23 : diagramme des fuites d'ions intracellulaires (Ca²⁺ et K⁺), d'ADN et de protéines provenant de cellules *E. coli* exposées à une irradiation MO [23]

La figure 23 montre les fuites d'ions intracellulaires (Ca²⁺ et K⁺), d'ADN et de protéines à partir des cellules exposées à l'irradiation MO. Les résultats montrent une augmentation des niveaux des protéines et d'ADN qui indique une perturbation de la barrière de perméabilité membranaire [23].

b. *S. aureus*

Tandis que l'intensité de fluorescence de Fluo-3 chez *S. aureus* n'a pas changée de manière significative avec l'augmentation de la température (50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C), mais ils étaient légèrement supérieurs à ce du groupe témoin, qui étaient de 4.1%, 6.0%, 21.9% et 19.7% respectivement. Indiquant que le niveau d'activité enzymatique de l'estérase non spécifique peut

Chapitre II : Résultats et discussion

hydrolyser Fluo-3/AM et se combiner avec le Ca^{2+} entrant, et il y a également un certain changement de perméabilité dans la membrane cellulaire (figure 24) [30].

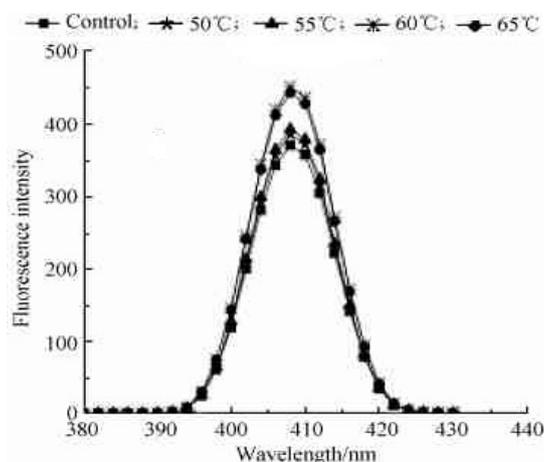


Figure 24 : l'intensité fluorescente de *S. aureus* déterminée par Fluo-3/AM après traitement aux MO [30]

Alors la membrane fournit une barrière de perméabilité au passage de petits ions tels que K^+ et Ca^{2+} . Il a été suggéré que les MO pourraient interagir avec la membrane cellulaire et subir des fuites de ces derniers, entraînant des changements irréversibles de sa perméabilité [23]. Cet effet porté sur la membrane peut induire une mortalité cellulaire [29].

II-1-3.3 Bioeffets sur l'ADN

Des cultures pures des coliformes fécaux ont été irradiées à 2450 MHz, puissance 1 kW, et d'autres ont été mises dans un bain marie, en suite, l'ADN extrait était étudié en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose et les concentrations sont déterminées par l'UV 260 à 280 nm [32]. Les résultats sont présentés dans la figure et le tableau ci-dessous.

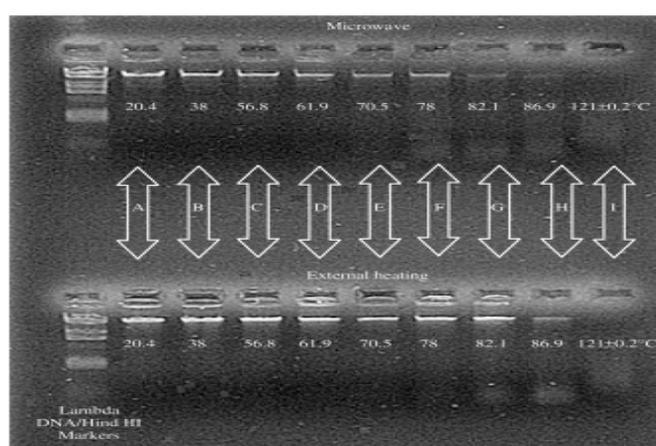


Figure 25 : résultat d'électrophorèse sur gel d'ADN génomique isolé à partir de coliformes fécaux prétraités par micro-ondes et chauffage externe [32]

Comme le montre la figure 25 les bandes d'ADN génomique des coliformes étaient de plus en plus faibles avec l'augmentation du temps d'irradiation ; à partir de bande D (61.9 °C), bande

Chapitre II : Résultats et discussion

E (70.5 °C), bande F (78.0 °C), bande G (82.1 °C) la bande la plus évanouie, et la bande H (86.9 °C), utilisant les MO, contrairement par chauffage externe ce phénomène n'a été observé qu'à partir de la bande de la piste H dans les mêmes températures [32].

Tableau 02 : concentrations d'ADN et ratio DO 260/280 [32]

échantillon	T °C	DO ₂₆₀	DO ₂₈₀	C _{ADN} (µg / ml)
Témoin	20,4 ± 0,2	0,453	0,359	22,67
MO ₁	38,0 ± 0,2	0,562	0,446	28,09
MO ₂	56,8 ± 0,2	0,396	0,290	19,82
MO ₃	61,9 ± 0,2	0,367	0,230	18,37
MO ₄	70,5 ± 0,2	0,292	0,316	14,61
MO ₅	78,0 ± 0,2	0,248	0,132	12,40
MO ₆	82,1 ± 0,2	0,169	0,194	8,46
MO ₇	86,9 ± 0,2	0,065	0,053	3,27

Le tableau 02 montre les concentrations d'ADN et le rapport DO 260/280 obtenus à partir des valeurs d'absorbance d'ADN. La concentration d'ADN du témoin était d'environ 22,67 µg / ml. Les concentrations diminuent à mesure que la température augmente. La concentration d'ADN des échantillons irradiés par MO a montré une diminution de plus de 74% au-dessus de 82,1 °C par rapport au témoin. Puisque l'absorbance des échantillons d'ADN à A280 indique la concentration des protéines et des acides nucléiques, le rapport A260 / A280 représente la pureté des échantillons d'ADN. En règle générale, A260 / A280 doit être compris entre 1,75 et 2 pour un ADN de bonne qualité. La plupart des ratios A260 / A280 en tableau 2 variait de 0,9 à 1,8, ce qui implique la destruction de l'ADN [32].

Les résultats de l'électrophorèse sur gel et de la DO ont révélé que la quantité et la concentration d'ADN des coliformes fécaux irradiées par MO diminuaient lorsque le temps d'irradiation aux MO augmentait, tandis que l'ampleur de la diminution de la quantité d'ADN était moins prononcée pour les coliformes fécaux chauffés de l'extérieur (chauffage au bain marie).

Chapitre II : Résultats et discussion

II-1-3.4 Bioeffets sur certains caractères biochimiques

a. Protéines et enzymes

Les effets des MO sur l'activité enzymatique et sur l'activité de DNase thermonucléase des souches *S. aureus* irradiées à 2450 MHz, pendant 20 s et 10,20, 30, 40 s chaque 0,5 h durant 3h sont respectivement présentés sur les tableaux 03 et 04 [26].

Tableau 03 : effets des microondes sur les activités enzymatiques chez *S. aureus* [26]

Enzymes	Sp act ^a		Ratio
	Témoin ^b	Irradiée ^c	Irradiée / témoin
La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD)	6,16	4,57	0,74
Malate déshydrogénase (MDH)	3,60	4,57	2,72
Cétoglutarate déshydrogénase (OGDC)	29,34	51,82	1,76
Lactate déshydrogénase (LDH)	2,89	2,81	1,97
Phosphatase alcaline	16,27	16,31	1,00
Cytochrome oxydase	0,45	0,55	1,23
ATPase			
Lysat cellulaire	0,81	1,26	1,55
Parois cellulaires	0,28	0,29	1,06

^a. les activités spécifiques de toutes les enzymes sauf l'ATPase sont exprimées en milliunités par milligramme de protéines totales, les activités spécifiques de l'ATPase sont exprimées en moles de phosphate inorganique libérées par gramme de protéine totale.

^b. les cellules ont été incubées à 34 °C.

^c. les cellules ont été irradiées pendant 20 s, la température du milieu était de 46 °C.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), LDH, des cellules irradiées par MO a diminuée par rapport au témoin approximativement de 0.74%, 1.97% respectivement, et l'activité de MDH, OGDC, phosphatase alcaline et cytochrome oxydase aient augmenté par rapport au témoin à des pourcentages de 2.72%, 1.76%, 1.97%, 1%, 1.23% respectivement. L'activité de l'ATPase liée

Chapitre II : Résultats et discussion

à la membrane ne semble pas être affectée par le rayonnement MO, alors que les activités des fractions cytoplasmiques ont été augmentées à la fois par rayonnement MO [26].

Tableau 04 : l'effet d'irradiation MO sur l'activité de thermonucléase de *S. aureus* [26]

Temps (h)	Diam des zones (mm)				
	Témoin	10 s	20 s	30 s	40 s
0	0	0	0	0	0
0,5	3,25	3,50	3	0	0
1	4,75	4,40	4,25	0	0
1,5	5,50	6,25	5,75	2,00	0
2	6,20	6,50	6,00	2,00	0
2,5	6,75	6,75	6,25	3,00	0
3	7,50	7,25	7,25	3,75	0

Les données indiquent également que peu ou pas d'activité enzymatique était présente après que les cellules ont été irradiées pendant 30 ou 40 s. Cela correspondait aux diminutions de survie des cellules ;

Les données de cette étude indiquent que le rayonnement MO affecte l'activité métabolique de *S. aureus* d'une manière qui ne peut être expliquée par les seuls effets thermiques. D'autre part, l'activité de la thermonucléase est étroitement corrélée avec une stimulation de la croissance des cultures, parce que des niveaux plus élevés d'activité enzymatique sont corrélés avec des nombres de cellules plus élevés et peu ou pas d'activité corrélée avec de faibles nombres de cellules, la quantité de biomasse cellulaire semble être directement responsable de la quantité de production et d'activité de thermonucléase [26].

Chapitre II : Résultats et discussion

Les résultats d'étude sur l'activité de la β -galactosidase des coliformes fécaux traités à 2450 MHz avec 1 kW pendant 0, 7, 12, 13, 15, 19, 21, 23 s et en température de 20.4, 38.0, 56.8, 61.9, 70.5, 78.0, 82.1, 86.9 °C donnent la courbe ci-dessous [32].

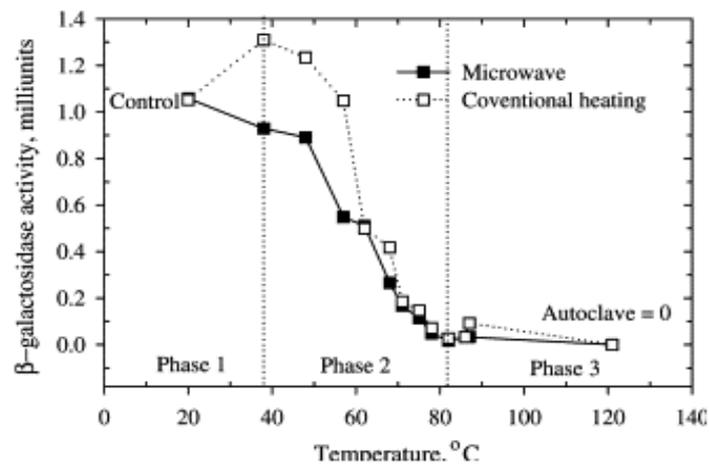


Figure 26 : résultats de l'activité de β - galactosidase des coliformes fécaux traités par micro-ondes et chauffage externe [32]

Les résultats des tests d'activité enzymatique β -galactosidase montrent que l'activité enzymatique a une forte diminution lorsque la température augmentait de 20 °C à 80 °C [32].

II-1-4 Etudes comparatives entre les bioeffets des MO sur *E. coli* et *S. aureus*

Les résultats du comptage des souches *E. coli* et *S. aureus* après l'irradiation à 2450 MHz, à différentes puissances (90, 360 et 900 W) pendant 60 s (figure 27), et à différentes durées (0 à 120 s) (figure 28), sont les suivants [24].

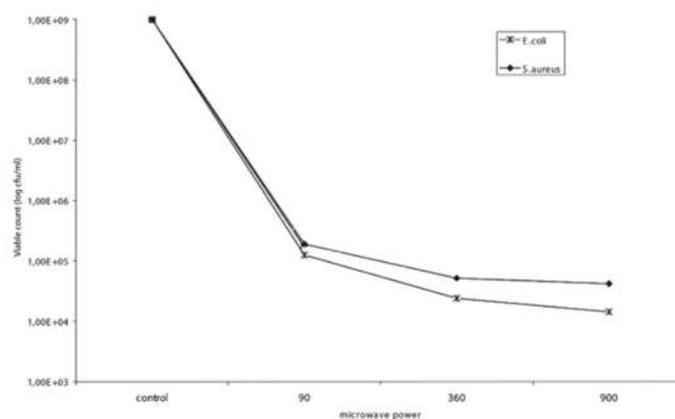


Figure 27 : effet de différentes puissances de MO sur le nombre d'*E. coli* et *S. aureus* viables [24]

La figure 27 présente l'effet des MO sur les suspensions bactériennes, en variant les puissances (90, 360 et 900 W). Une forte diminution de viabilité des deux souches à la puissance 90 W, en

Chapitre II : Résultats et discussion

suite on remarque à partir de cette puissance que la viabilité des souches *E. coli* est influencée plus que celle de *S. aureus*.

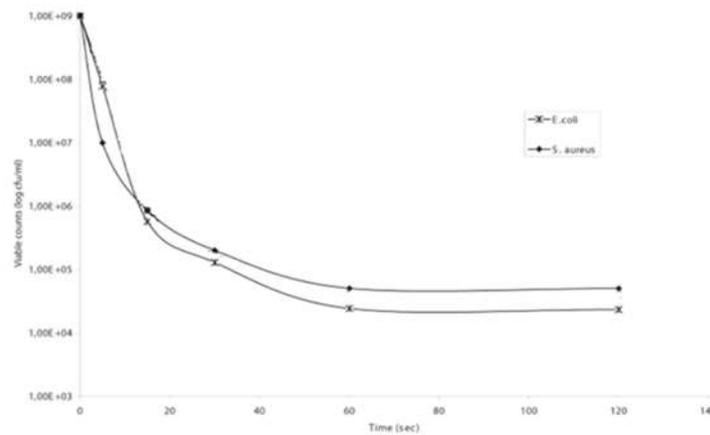


Figure 28 : courbe du changement du comptage viable de cellules bactériennes irradiées (*E. coli*, *S. aureus*) [24]

La figure 28 qui présente l'effet des MO à la fréquence 2450 MHz sur les cellules bactériennes *E. coli* et *S. aureus* pendant 120 s, montre qu'une inactivation rapide de chaque cellule bactérienne examinée a été observée dans les premières 60 secondes. Après cette période, aucun changement considérable n'a été observé sur la quantité de cellules viables et il s'est fixé comme temps de contact optimal [24].

En comparaison entre inactivation des cellules *E. coli* et *S. aureus*, on remarque que après 20 s, une diminution plus importante chez *E. coli* que chez *S. aureus*.

Les figures suivantes présentent les résultats d'observation au MEB des souches *S. aureus* et *E. coli* irradiées à 2450 MHz, à la même puissance et au même temps [29].

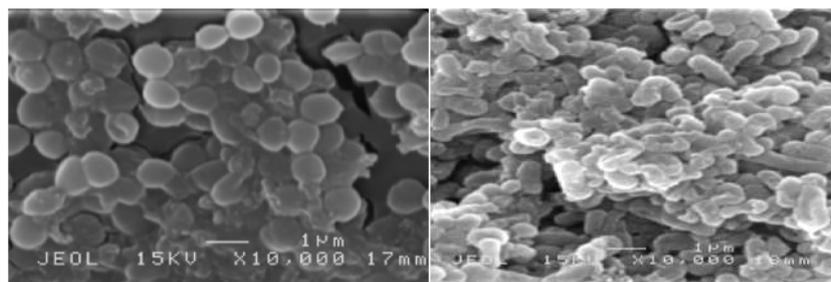


Figure 29 : photo de changement dans la morphologie des souches bactériennes de *S. aureus* (à gauche) et *E. coli* (à droite) suite à une irradiation pendant 2,5 min à la puissance 300 W (x10000) [29]

Dans la figure 29 on voit clairement que les souches *E. coli* sont endommagées plus qu'aux souches *S. aureus* à la même puissance 300 W et en même temps 2,5 min.

Chapitre II : Résultats et discussion

La figure 30 montre une déformation de structure plus remarquable des souches *E. coli* en comparaison à celles des souches *S. aureus*, à la même fréquence 2450 MHz, et à puissance 1000 W pendant 2,5 min.

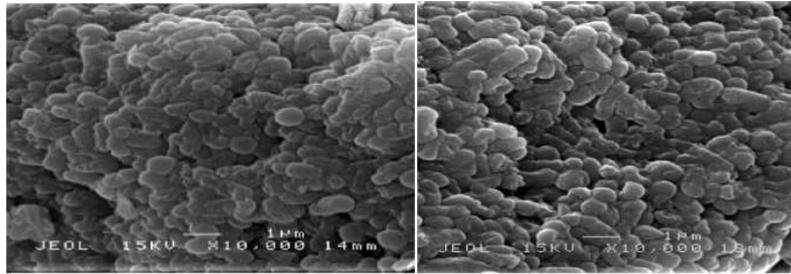


Figure 30 : photo de changement dans la morphologie des souches bactériennes. *S. aureus* (à gauche) et *E. coli* (à droite) suite à une irradiation pendant 2,5 min à la puissance 1000 W (x10000) [29]

Des résultats similaires ont été trouvés dans d'autres études sur l'effet des MO sur les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif, où les bactéries à Gram négatif telles que *E. coli* sont les plus sensibles au traitement par MO que celles à Gram positif, telles que *S. aureus* [39, 40].

II-1-5 Paramètres affectant les bioeffets des MO

II-1-5.1 Puissance et temps

La figure 31 montre l'effet des MO sur la survie d'*E. coli* sous les niveaux de puissance élevés (700 W) et faibles (119 W) et en un certain temps d'irradiation.

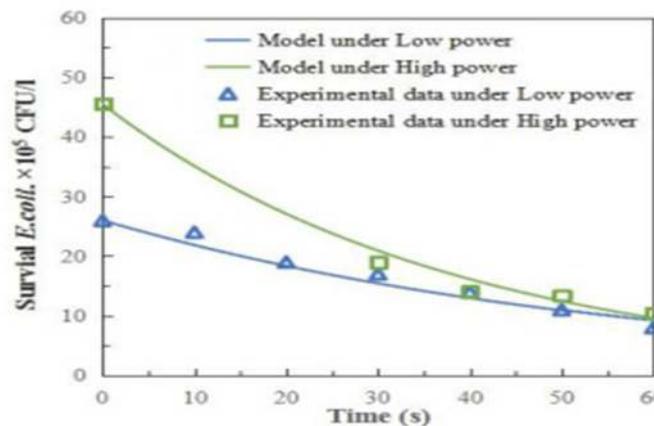


Figure 31 : données expérimentales et résultats de simulation de modèles pour *E. coli*. Les lignes pleines bleues et vertes montrent les courbes du modèle sous faible puissance (119 W) et haute puissance (700 W), respectivement. Les points carrés triangulaires bleus et verts représentent des données expérimentales sous faible puissance (119 W) et haute puissance (700 W), respectivement [23]

Les résultats de la figure 31 indiquent que l'irradiation MO des souches *E. coli* a un effet remarquable sur la survie des cellules. La simulation du modèle a également clairement

Chapitre II : Résultats et discussion

démontré que le niveau de la puissance élevée présente de meilleures performances d'inactivation que ceux sous le niveau de puissance faible [23]. Des mêmes résultats sont trouvés dans autre étude [41].

La réduction complète des bactéries *E. coli* peut être obtenue sur des temps de contact courts lorsque le matériau est irradié à des niveaux de puissance MO plus élevés ce qui produit une augmentation rapide de la température, ce qui est un facteur clé de la mort bactérienne. Bien que 70 °C soit considéré comme la température minimale létale pour les bactéries pathogènes, les microorganismes doivent être exposés pendant une durée minimale supplémentaire pour assurer une mort complète [42].

L'efficacité de la destruction des micro-organismes à l'aide de MO dépend du temps d'exposition et de la puissance du champ électromagnétique utilisé [24, 43, 44, 47].

II-1-5.2 Volume

Quand le volume de liquide est plus petit ou que le rapport de la surface au volume est plus grand, il sera plus facile pour les MO de chauffer le liquide avec une perte diélectrique plus élevée. C.-à-d. que la force du chauffage induit par l'irradiation aux MO peut être influencée également par la forme du récipient [25].

L'augmentation du volume de liquide a exacerbé les effets destructeurs du rayonnement MO sur les bactéries vivantes, alors que la quantité de liquide dans le milieu joue un rôle important dans l'absorption de l'énergie créée par le rayonnement micro-ondes [48].

II-1-5.3 Milieux de culture et leurs compositions

Une transformation de la bactérie *E. coli* de milieu liquide en milieu gazeux, en utilisant un générateur d'aérosol, pour aérosoliser la suspension, puis transfusion dans le tube d'irradiation MO à 2450 MHz, 119 - 700 W pendant 20 min. pour découvrir l'effet porté par les MO sur les bactéries dans un milieu dépourvu d'eau. Les résultats de cette étude sont montrés sur la figure 32 [23].

Chapitre II : Résultats et discussion

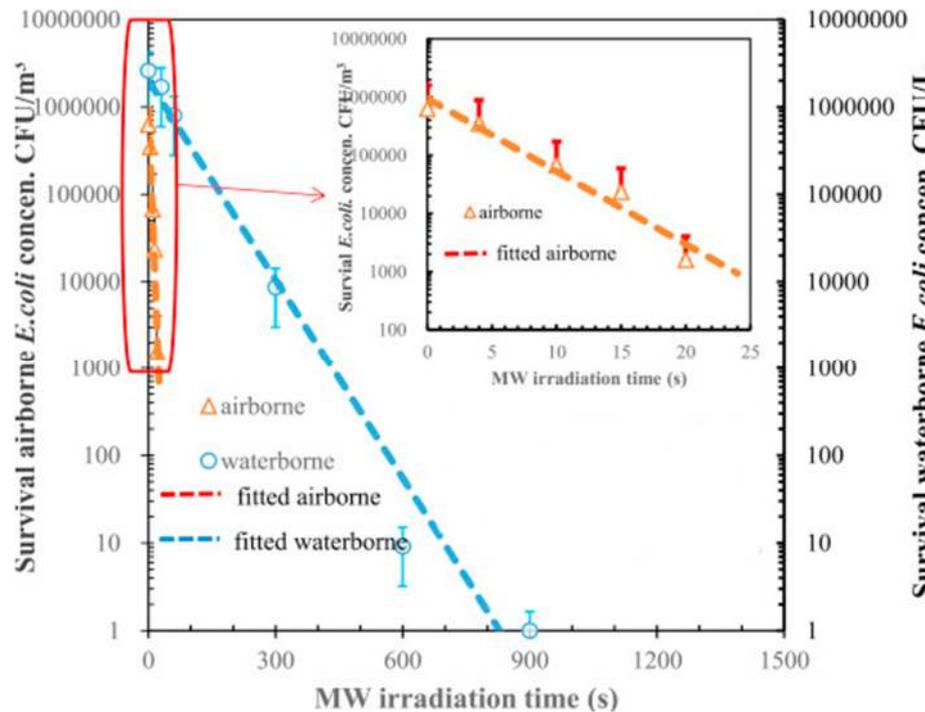


Figure 32 : performance d'inactivation d'*E. coli* en suspension dans l'air et dans l'eau. Les points circulaires triangulaires rouges et bleus représentent les données expérimentales pour les essais en suspension dans l'eau et dans l'air, respectivement. Et les lignes pointillées sont les courbes ajustées [23]

L'inactivation d'*E. coli* en suspension dans l'air a atteint une réduction de 2,6 log (élimination > 99%) en 20 s, mais une activité similaire sur *E. coli* en suspension dans l'eau a été observée après 5 min (300 s). Le taux d'inactivation d'*E. coli* en suspension dans l'air était près de 20 fois plus élevé que celui des *E. coli* en suspension dans l'eau. Une diminution linéaire des concentrations logarithmiques de survie d'*E. coli* avec le temps d'irradiation (figure 32), ce qui montre que l'irradiation MO des *E. coli* en suspension dans l'air est une réduction plus rapide par rapport à celle des *E. coli* en suspension dans l'eau [23].

La réduction des bactéries cultivées en milieu liquide est rapide par rapport à celles dans un milieu solide [46, 48].

Chapitre II : Résultats et discussion

L'effet de la concentration de composés ioniques, la figure 33 (a) montre l'effet de différentes concentrations de NaCl et KCl sur l'inactivation d'*E. coli* en suspension dans un tampon phosphate par irradiation aux micro-ondes à 2450 MHz pendant 20 s [25].

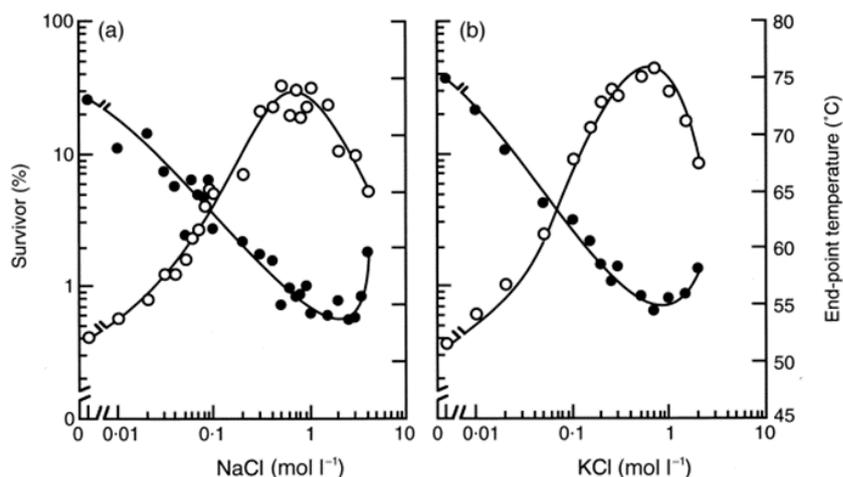


Figure 33 : courbes de l'effet des concentrations de NaCl (a) et de KCl (b) sur les taux d'inactivation d'*E. coli* et sur la température finale obtenue par irradiation aux MO, (●) : nombre de cellules survivantes, (○) : les températures de point final [25]

Les cellules ont été inactivées avec des concentrations croissantes de NaCl, et l'effet maximal a été exercé vers 0,5 – 1,0 mol. l⁻¹ due également à l'augmentation de température. Le même profil à la fois de l'inactivation cellulaire et de l'augmentation de la température a également été observé avec KCl (figure 33b), donc les taux d'augmentation de température et d'inactivation des cellules ont été accélérés par certaines concentrations de composés ioniques tels que NaCl et KCl. En général, les solutions ioniques ont une électro-conductivité plus élevée et leurs caractéristiques électriques sont beaucoup plus proches des conducteurs que l'eau pure. Par conséquent, il a été supposé que lorsqu'une solution ionique était irradiée par micro-ondes, un courant de Foucault serait généré à la surface de la solution, et l'énergie des micro-ondes y serait réfléchi par le courant de Foucault. Ainsi, une solution ionique sera chauffée beaucoup plus mal que l'eau pure par irradiation MO [25].

II-2 DISCUSSION

Une onde qui se propage peut rencontrer des obstacles de nature différente comme par exemple, l'air, l'eau, le plastique, un milieu biologique, etc. Lorsque l'onde électromagnétique entre en contact avec la matière, il peut se produire plusieurs types d'interactions en fonction de la longueur d'onde, de la taille de l'objet rencontré par le rayonnement et des caractéristiques physiques des milieux traversés et de l'objet lui-même [56]. Une interaction entre un

Chapitre II : Résultats et discussion

rayonnement électromagnétique et la matière peut se traduire par une diffusion sans transfert d'énergie ni changement de fréquence (diffusion élastique) ou par un transfert au matériau de tout ou partie de l'énergie du rayonnement. Dans ce dernier cas, l'énergie incidente est en partie absorbée par la matière et en partie diffusée sous la forme d'un nouveau rayonnement électromagnétique de fréquence plus basse (diffusion inélastique). La fraction absorbée peut avoir un éventuel effet biologique. Elle peut entraîner une transition énergétique et/ou un effet thermique [49]. L'étude de ces interactions entre microonde et bactérie remonte à Brown et Morrison (1954) [50].

L'irradiation par MO des souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus* à 2.45 GHz, a un effet significatif sur le dénombrement cellulaire dans une période courte de quelques secondes, due à une augmentation rapide de température dans le milieu. Cette chaleur générée par les MO a été considérée comme étant principalement responsable de l'inactivation cellulaire [24, 25, 28, 45]. Les absorbeurs de micro-ondes interagissent avec les micro-ondes pour produire de la chaleur en raison de sa tangente de perte diélectrique ($\tan\delta$) $\tan\delta = \varepsilon''/\varepsilon'$, dont : ε' est la constante diélectrique (ou permittivité réelle), et ε'' est le facteur de perte diélectrique (ou permittivité imaginaire). La constante diélectrique est le facteur de contrôle qui détermine la quantité d'énergie absorbée tandis que le facteur de perte diélectrique détermine la quantité d'énergie dissipée [51]. Cependant les microorganismes exposés à des traitements thermiques (MO) à des températures létales, la population diminue de façon exponentielle avec la durée du chauffage. Lorsque la population microbienne résiduelle est tracée sur une échelle semi-logarithmique en fonction du temps, une courbe linéaire est obtenue. Ce profil peut être représenté par une réaction de premier ordre [52].

Le changement dans la morphologie des cellules bactériennes *E. coli* et *S. aureus* irradiées par MO, observée en microscope électronique à balayage par rapport à celle de témoins, ainsi que, la diminution des nombres des bactéries viables dans les suspensions irradiées prouvent que la paroi cellulaire est également endommagée par les microondes [24, 28, 29]. La cible principale du rayonnement micro-ondes dans une cellule vivante est une membrane biologique [53], dont les modifications entraînent une violation du transport de substances entre la cellule et l'environnement détectées par le dosage des protéines, ions (K^+ , Ca^{+2}), ADN par spectrophotomètre a également montré que les cellules traitées par MO pourraient former des pores irréversibles dans la membrane cellulaire conduisant à une explosion de composés cellulaires microbiens [23, 27]. En outre, il semble qu'il existe une relation entre l'ADN génomique affecté par les MO et l'activité bactérienne [32]. La littérature technique contient des informations sur les modifications de la structure de l'ADN lorsqu'il est exposé à un

Chapitre II : Résultats et discussion

rayonnement micro-ondes. Les troubles de l'ADN, appelés aberrations chromosomiques, se manifestent dans différents gènes, ce qui entraîne un dysfonctionnement dans la production des éléments fonctionnels et structurels de la cellule, qui sont l'ARN et les protéines [53].

L'application d'un traitement par micro-ondes à des micro-organismes dénature la structure de la protéine cellulaire et entraîne l'extrusion de la matrice cellulaire microbienne, tuant progressivement les micro-organismes [55].

L'inactivation des cellules dépend de nombreux facteurs micro-ondes et microbiens.

La variation des performances d'inactivation doit être liée à la nature transformatrice du MO dans différents milieux, solide [46, 48], milieu liquide, où la partie considérable de l'énergie peut être utilisée pour augmenter la température de l'eau au lieu d'inactiver les bactéries présentes dans l'eau, et dans le milieu gazeux dont la plupart des photons MO peuvent réagir directement avec les cellules microbiennes cibles [23]. Ainsi c'est lié à la concentration des suspensions (biomasse), volume, et récipient, dont le volume faible (milieu liquide) avec un récipient large aura une réaction diélectrique plus forte [45], et même avec l'ajout de certaines concentrations des sels (NaCl, KCl) duquel la solution possède une conductivité plus élevée et des caractéristiques électriques plus proches des conducteurs que l'eau pure car une solution ionique avec une conductivité électrique plus élevée que l'eau pure [25].

Les expositions électromagnétiques varient en fonction de nombreux paramètres physiques : puissance (taux d'absorption spécifique, densité de puissance incidente), longueur d'onde / fréquence, champ proche - champ lointain, polarisation (linéaire, circulaire), modulation (amplitude, fréquence), durée globale et intermittence de l'exposition (continue, interrompue) [54]. Le taux d'absorption spécifique (TAS) ou la densité de puissance (PD) est un déterminant principal des effets thermiques MO. De nombreux autres paramètres physiques d'exposition peuvent être importants pour les effets biologiques dits non thermiques, qui sont induits par les MO à des intensités bien inférieures à tout échauffement [54].

Il existe deux modes d'action des micro-ondes, qui incluent l'effet thermique et l'effet non thermique [55]. Il a été constaté que les micro-organismes n'étaient inactivés qu'en présence d'eau et que les organismes secs ou lyophilisés n'étaient pas affectés même par des expositions prolongées. C'est-à-dire les micro-organismes sont tués uniquement par "effet thermique" et que, très probablement, il n'y a pas "d'effet non thermique" ; les constituants cellulaires autres que l'eau n'absorbent pas suffisamment d'énergie pour tuer les cellules microbiennes [62]. Une autre étude montre que l'effet non thermique joue un rôle dominant dans la décontamination microbienne par rapport aux effets thermiques, il semble que la rotation et l'alignement des

Chapitre II : Résultats et discussion

molécules aient été produits à la suite des rayonnements micro-ondes. Cela aboutit finalement au déploiement d'enzymes ou de protéines et à la dégradation des ribosomes, résultant finalement en une dénaturation complète ou partielle des composants cellulaires [55].

Les MO provoquent l'accélération et la collision des ions avec d'autres molécules ou provoquent la rotation et l'alignement rapide des dipôles avec un champ électrique alternatif (2450 millions de fois / s) entraînant un changement dans la structure secondaire et tertiaire des protéines des micro-organismes [57].

Le traitement par micro-ondes a été une technologie prometteuse [58], tandis que les effets non thermiques des micro-ondes sont controversés [59], malgré de nombreuses études sur les effets des MO à faible et de forte puissance sur les systèmes biologiques, le mécanisme responsable des bioeffets observés reste incertain. En raison du manque d'informations sur le mécanisme d'interaction entre les micro-ondes et les systèmes biologiques [46], mais il reste que le rayonnement micro-ondes considéré comme ayant des effets à la fois thermiques et non thermiques [59].

Un traitement MO appropriée nécessitera un temps de contact plus court qu'un réacteur thermique conventionnel pour atteindre le même niveau de traitement. Cela implique à son tour des économies de temps et, en fin de compte, des besoins en espace du réacteur lorsque l'irradiation MO est appliquée [42, 43, 60]. En plus par rapport aux UV qui pourraient être utilisés avec succès pour désinfecter les microorganismes. Néanmoins, les dommages à l'ADN causés par le rayonnement ultraviolet ont un phénomène réversible, par conséquent, la stérilisation n'est pas complète. La constante de vitesse d'inactivation de l'irradiation MO est la plus élevée [41]. Aussi dans une étude sur les brosses à dents contaminées par *Streptococcus mutans*, un type de bactérie qui peut provoquer des caries dentaires, le rayonnement d'un four à micro-ondes à «haute puissance» pendant cinq minutes a complètement décontaminé les brosses à dents; il était plus efficace que le chlorure de cétypyridinium antiseptique ou le rayonnement UV [61].

Conclusion

Conclusion

La décontamination des souches bactériennes, telles que *E. coli* et *S. aureus*, par les microondes dont la fréquence égale à 2450 MHz, est exprimée par un effet thermique, qui est due au mouvement dipolaires de la molécule de l'eau, et c'est l'effet majeur qui inactive les bactéries. Par contre, dans certains cas, l'inactivation des bactéries ne peut pas être expliquée seulement par l'effet thermique (effet non-thermique ou spécifique). Mais il reste un manque des informations sur l'interaction de l'onde et la matière biologique. Alors que, ces effets sont également manifestés sur la paroi cellulaire des souches bactériennes, la membrane plasmique qui présente le point cible des rayonnements microondes, ADN (son dysfonctionnement altère les activités cellulaires qui conduisent à l'inactivation de la cellule bactérienne), protéines et les enzymes.

L'efficacité des traitements par micro-ondes sur la décontamination des micro-organismes dépend d'attributs importants, à savoir la puissance des micro-ondes et le temps d'exposition. Quand l'échantillon est irradié à des puissances élevées, la destruction des bactéries est plus rapide en temps d'exposition court. En plus la nature (liquide, aérosolisé) et les compositions des milieux de cultureensemencés, où les suspensions dans l'air présentent un taux de réduction de nombre des cellules viable plus rapide que celles des cellules en suspension dans l'eau avec même conditions de traitement. Le volume élevé également diminue les concentrations des germes dans le milieu, ce qui rend le traitement plus facile surtout avec utilisation d'un récipient large.

En général, la possibilité d'utiliser les MO comme technologie de décontamination dépend de différents modes d'utilisation. Alors que pour un meilleur résultat de destruction bactérienne, il est conseillé d'utiliser des puissances élevées ou des irradiations répétitives.

En perspective, il sera intéressant de mener des études sur l'interaction d'une microonde avec la cellule bactérienne cible (thermorésistante), pour développer cette technologie dans le domaine de décontamination et pour qu'elle ne présente pas un risque sur l'Homme et son environnement.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- [1] : P. F. Combes, (1996), Micro-ondes 1.ligne guides et cavités, éd Dunod, Talouse, 374 pp.
- [2] : J. P. Guiraud, (1998), Microbiologie alimentaire, Paris.
- [3] : J. P. Dedet, (2007), La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes, éd Dunod, Paris, 262 pp.
- [4] : R. Barbault, (2000), Ecologie générale Structure et fonctionnement de la biosphère, 5^{ème} édition, éd Dunod, Paris.
- [5] : A. J. Drapeau et S. Jankovic, (1977), Manuel de microbiologie de l'environnement, Organisation mondiale de la sante, Genève.
- [6] : Richard d'Ari et G. Sezonov. (Aout 2008), Les organismes modèles Biologie et génétique d'*Escherichia coli*, éd Belin, Paris.
- [7] : J. L. Avril et *al.* (1992), Bactériologie Clinique, France, 2^{ème} édition, 505 pp.
- [8] : Prescott et *al.*, (Octobre 2013), Microbiologie, 4^{ème} édition, Paris.
- [9] : M. Federighi, (2005), Bactériologie alimentaire, 2^{ème} édition, 282 pp.
- [10] : T.-X. Nhan et *al.*, (2012), Diagnostic et traitements des infections toxiques à *Staphylococcus aureus*, journal des Anti-infectieux, V. 14, N. 3, P. 117-126.
- [11] : R. Brielle, (2016), Etude fonctionnelle d'un système toxineantitoxine de type I exprimé par *Staphylococcus aureus* et d'ARN régulateurs associés aux ribosomes bactériens, thèse d'Université de Rennes 1.
- [12] : C. Levy, (2010), Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires : Université d'Avignon. In H. Aouadi et H. Kaddour, (2018), Cinétique de destruction des micro-organismes par microonde et ultrason, cas d'étude : Boues résiduares de station d'épuration de la ville de Bouira, Mémoire, Universite Akli Mohand Oulhadj, Bouira.
- [13] : X. Marchandise et *al.*, (2007), Biophysique pour les sciences de la vie et de la santé, éd Omniscience, Paris, 1080 pp.
- [14] : M. Heistercamp et *al.*, (2002), Les Micro-ondes, éd Printemps des sciences, Bruxelles, Paris.

Références bibliographiques

- [15] : L. H. Wakim, (2008), Effet d'un chauffage micro-ondes et conventionnel sur la thermorésistance d'une Salmonelle traitée dans un produit à basse activité d'eau. Conséquences sur la qualité du produit, Thèse de doctorat d'Ecole nationale supérieure d'industries agricoles et alimentaires.
- [16] : L. Bourdon et N. Marchal, (1973), Techniques bactériologiques, éd Doin, Paris, 335 pp.
- [17] : G. J. Tortora, (2003), Introduction à la microbiologie, éd Renouveau Pédagogique Inc, Canada, 945 pp.
- [18] : M. Senouci Bereksi et DE. Abdelouahid, (2010), Méthode et technique en bactériologie, place central-Ben-Aknoun, Algérie.
- [19] : N. Marchan et J.L. Bourdon, (1973), Milieux de culture et identification biochimique des bactéries, Paris, 179 pp.
- [20] : F. Denis et *al*, (2011), Bactériologie médicale Techniques usuelles, 2ème édition, éd Elsevier. Paris.
- [21] : T. Hart et P. Shears, (1997), Atlas de poche de microbiologie, 2ème édition, Paris, 313 pp.
- [22] : C. Delarras, (2014), Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche des bactéries et de levures-moisissures, éd Lavoisier, Paris.
- [23] : C. Wang et *al*, (2019), Airborne disinfection using microwave-based technology: Energy efficient and distinct inactivation mechanism compared with waterborne, disinfection, Journal : Aerosol Science, V. 137, P. 105 - 437.
- [24] : S. Gedikli et *al*, (2008), Effect of microwaves on some Gram negative and Gram positive Bacteria, Journal : Applied Biological Sciences V. 2, N. 1, P. 67 - 71.
- [25] : K. Watanabe et *al*, (2000), Effect of ionic strength on the inactivation of microorganisms by microwave irradiation, Journal : Applied Microbiology, V. 31, P. 52 - 56.
- [26] : M. S. Dreyfuss et J. R. Chipley, (1980), Comparison of effects of sublethal microwave radiation and vonventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*, Journal : Applied and Environmental Microbiology, V. 39, N. 1, P. 13 - 16.

Références bibliographiques

- [27] : H. Khalil et R. Villota, (1988), Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating, Journal : Food Protection, V. 51, N. 3, P. 181 - 186.
- [28] : IM-Sun Woo et al, (2000), Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure, Journal : Applied and Environmental Microbiology, V. 66, N. 5, P. 2243 - 2247.
- [29] : Z. A. Mousa Al-Ibraheemi, (2018), Effects of microwave radiation on the survival of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli O157:H7* in Health Care Waste, Journal : Agricultural research, V. 7, N. 2, P. 83 - 104.
- [30] : Feng hang et al, (2007), Alteration of membrane permeability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* during microwave sterilization, V. 47, No. 4. P. 697 - 701.
- [31] : P. A. Sharpe et al, (1973), Detection of two restriction endonuclease activities in haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry, V. 12, N. 30, P. 55 – 63, in S. M. HONG et al (2004), Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids, Journal : Water Research, V. 38, P. 1615 - 1625.
- [32] : S. M. HONG et al (2004), Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids, Journal : Water Research, V. 38, P. 1615 - 1625.
- [33] : Willey, Sherwood, Woolverton, (2018), Microbiologie de Prescott, 5^{ème} édition, Paris.
- [34] : D. ROBERT, (2013), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive, Université Angers, France.
- [35] : S. EDOUARD et al, (Mars 2011) Farma-Memo fiches des synthèses illustrées, Infectiologie, éd Vernazobres-Greggo, Paris, 321 pp.
- [36] : M. Diassana Abraham, (2018), Identification des souches d'*Escherichia coli* dans les selles en rapport avec la malnutrition à Dioro, Thèse d'université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali.
- [37] : Paul De Vos et al, (1989), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2^{ème} édition, volume 3, éd Springer, London, New York.

Références bibliographiques

- [38] : Lansing M. Prescott, 2002, Microbiology, 5^{ème} édition, 1026 pp.
- [39] : A. Ashur, (2013), Inactivation of pathogenic micro-organisms in hospital waste using a microwave, Journal : Material Cycles and Waste Management, V. 15, P. 393–403.
- [40] : S. Dixit *et al*, (2019), Comparison of anti-microbial effects of low-level laser irradiation and microwave diathermy on Gram-positive and Gram-negative bacteria in an in vitro model, journal Medicina, V. 55, P. 330.
- [41] : C. Wang *et al*, (2020), Microwave-induced release and degradation of airborne antibiotic resistance genes (ARGs) from *Escherichia coli* bioaerosol based on microwave absorbing material, Journal : Hazardous Materials, V. 394, P. 122 - 535.
- [42] : M. Peter, (2016), Evaluation of a microwave based reactor for the treatment of blackwater sludge, journal : Science of The Total Environment, V. 548–549, P. 72 - 81.
- [43] : M. Chen, (2017), Synergistic bactericidal effects of basic amino acids and microwave treatment on *Escherichia coli*, journal : LWT, V. 84, P. 99-105.
- [44] : D.K.H. JENG *et al*, (1987), Mechanism of microwave sterilization in the dry state, Journal : Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology, V. 53, No. 9, P. 2133 - 2137.
- [45] : C. B. A. Yeo, (1999), Heat transfer analysis of *Staphylococcus aureus* on stainless steel with microwave radiation, Journal : Applied Microbiology, V. 87, P. 396 - 401.
- [46] : C. Rougier *et al*, (2014). Thermal and nonthermal effects of discontinuous microwave exposure (2.45 gigahertz) on the cell membrane of *Escherichia coli*, Journal : Applied and Environmental Microbiology, V. 80, P. 4832 - 4841.
- [47] : T. W. Speir, (1986), Effects of microwave radiation on the microbial biomass, phosphatase activity and levels of extractable N and P in a low fertility soil under pasture, Journal : Soil Biology and Biochemistry, V. 18, No. 4, P. 371 - 382.
- [48] : S. Atmaca *et al*, (1996), Effect of microwaves on survival of some bacterial strains, journal : Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, V. 43, N. 4, P. 371 - 378.
- [49] : A. Perrin et M. Souques, (2010), Champs électromagnétiques, environnement et santé, éd Springer-Verlag, Paris, France, 171 pp.

Références bibliographiques

- [50] : C.B.A. Yeo, (1999), Heat transfer analysis of *Staphylococcus aureus* on stainless steel with microwave radiation, Journal : Applied Microbiology, V. 87, P. 396 - 401.
- [51] : Aswathi Soni et al, (2020), Microwave-induced thermal sterilization- A review on history, technical progress, advantages and challenges as compared to the conventional methods, Journal : Food Science & Technology, V. 97, P. 433 - 442.
- [52] : P. G. Widehem et J. Claude Laguerre, (2017), Characterization of Microbial Inactivation by Microwave Heating, Journal : Global Food Security and Wellness, P. 489 - 517.
- [53] : F. Apollonio et al, (2013), feasibility for microwaves energy to effect biological systems via non thermal mechanisms : a systematic approach, IEEE, transactions on microwave theory and techniques, V. 61, N. 5, P. 2031 – 2045. In L. V. Kioresku, (2019), Intensification of bacterial-chemical leaching of nickel, copper and cobalt from sulfide ores using microwave radiation, Journal : Mining Institute, V. 239, P. 528 - 535.
- [54] : Igor Belyaev, (2005), Non-thermal biological effects of microwaves, Microwave Review, P. 13 - 29.
- [55] : E. J. Rifna et al, (2019), Effect of thermal and non-thermal techniques for microbial safety in food powder: Recent advances, Journal : Food Research International, V. 126, P. 108 - 654.
- [56] : C. Rougier, (2003), Etude des interactions entre la bactérie *Escherichia coli* et les micro-ondes appliquées en mode discontinu dans des conditions faiblement thermiques, thèse d'Université Limoges.
- [57] : S. Banik, (2003), Bioeffects of microwave—a brief review, Bioresource Technology V. 87, P. 155 - 159.
- [58] : Changkai Guo, (2020), Non-thermal effects of microwave processing on inactivation of *Clostridium sporogenes* inoculated in salmon fillets, Journal : LWT, V. 133, P. 109 - 861.
- [59] : HB Dogan Halkman, (2014), NON-THERMAL PROCESSING | Microwave, Encyclopedia of Food Microbiology, 2^{ème} Edition, P. 962 - 965.
- [60] : K. Mrinal et al, (2014), Does microwave sterilization of growth media involve any non-thermal effect?, Journal : Microbiological Methods, V. 96, P. 70 - 72.

Références bibliographiques

- [61] : K. B. Ginquère et al (2011), Disinfection of toothbrushes contaminated with *Streptococcus mutans*, Journal : Dentistry, V. 24, N. 3, P. 155 - 158.
- [62] : GR Vela et J F Wu, (1979), Mechanism of lethal action of 2,450-MHz radiation on microorganisms, Journal : Applied and Environmental Microbiology, V. 37, N. 3, p. 550-553.
- [63] : <https://microbiologie-clinique.com/Examen-microscopique.html>
- [64] : <https://sites.google.com/site/lemetierdebacteriologiste/autres-supports>
- [65] : <https://slideplayer.fr/slide/457962/>
- [66] : <https://studylibfr.com/doc/1104127/la-catalase>
- [67] : <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf?la=en>
- [68] : <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/beta-galactosidase-enzyme-assay-system-with-reporter-lysis-buffer-protocol/>
- [69] : <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-mac-conkey>
- [70] : <https://docplayer.fr/88066663-At5-biotek-orientation-de-l-identification-de-quatre-germes-yves-dabat-ste-anne-anglet.html>

Résumé

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 300 MHz et 300 GHz. Elles ont un large domaine d'utilisation dans des différents secteurs, duquel le secteur de la biologie, leur utilisation comme une nouvelle technologie de décontamination dépend de leurs bioeffets sur les microorganismes.

L'objectif de notre travail est d'étudier les bioeffets des microondes sur les souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* à la fréquence 2450 MHz à différentes puissances et différentes durées d'exposition, en se basant sur les informations collectées à partir des recherches antérieures qui traitent ce sujet.

Les résultats montrent que les bioeffets des microondes, à des puissances élevées et à courtes durées sur les deux souches bactériennes étaient significatifs, provoquant des effets destructifs en ciblant la membrane cytoplasmique et le génome, ces effets manifestent beaucoup plus chez *E. coli*.

Les effets des microondes sur *E. coli* et *S. aureus* présentent une performance, qui permet d'utiliser ces ondes comme technologie de décontamination dans le secteur de biotechnologie.

Mots clés : microondes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bioeffets, décontamination.

Abstract

Microwaves are electromagnetic waves with frequencies between 300 MHz and 300 GHz. They have a wide field of use in different sectors, of which the biology sector, their use as a new decontamination technology depends on their bioeffects on microorganisms.

The objective of our work is to study the bioeffects of microwaves on the bacterial strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at the frequency 2450 MHz at different powers and different durations of exposure, based on information collected from previous research, which has relation with this topic.

The results show that the bioeffects of microwaves, at high powers and at short durations on the two bacterial strains were significant, causing destructive effects by targeting the cytoplasmic membrane and the genome, these effects manifested much more in *E. coli*.

The effects of microwaves on *E. coli* and *S. aureus* present a performance, which allows these waves to be used as a decontamination technology in the biotechnology sector.

Keywords : microwaves, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bioeffects, decontamination.

ملخص

الموجات الدقيقة هي موجات كهرومغناطيسية بترددات تتراوح بين 300 ميغاهرتز و300 جيجاهرتز. لديهم مجال واسع للاستخدام في قطاعات مختلفة، منها قطاع البيولوجيا، يعتمد استخدامها كتقنية جديدة لإزالة التلوث على تأثيراتها الحيوية على الكائنات الحية الدقيقة.

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثيرات الحيوية للموجات الدقيقة على السلالات البكتيرية *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* على تردد 2450 ميغاهرتز بقدرات وفي اوقات مختلفة من التعرض للإشعاع، و هذا بناءً على المعلومات التي تم جمعها من الأبحاث السابقة والتي تعالج نفس هذا الموضوع.

أظهرت النتائج أن التأثيرات الحيوية للموجات الدقيقة بقوة عالية وفترات قصيرة على السلالتين البكتيريتين كانت كبيرة، مما تسبب في آثار مدمرة من خلال استهداف الغشاء السيتوبلازمي والجينوم، وقد تجلت هذه التأثيرات أكثر بكثير في *E. coli* تقدم تأثيرات الموجات الدقيقة على السلالات البكتيرية *E. coli* و *S. aureus* أداءً يسمح باستخدام هذه الموجات كتقنية لإزالة التلوث في قطاع التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات المفتاحية : الموجات الدقيقة، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، التأثيرات البيولوجية، إزالة التلوث.