

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaia



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : M^{elle} LAOUAR Maroua & M^{elle} TALEBAHMED Afaf

Thème :

Contribution à la Détermination *in vitro* le degré de pathogénicité de six souches à effet PGP

Soutenu publiquement, le 05/09/2022, devant le jury composé de :

Mr. Djellid Y	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Président du jury
Mr. Ider S	Maître de Conférences B	Univ. Ghardaïa	Examineur
Mr. Bakelli A	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Encadrant
Mme. Kheloufi M	Doctorante	Univ. Ghardaïa	Co-Encadrant

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Nous remercions Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans des bonnes conditions.

*Au terme de cette étude, mes reconnaissances respectueuses vont d'abord notre encadrant **Mr Bakelli**, pour avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour ses précieux conseils, orientations, sa gentillesse et sa disponibilité.*

*Nous aimerons remercier aussi l'équipe de laboratoire **BIO7** pour leurs aides à réaliser ce travail.*

Un grand merci à nos familles respectives pour leurs soutiens et leurs affections sans retenue au cours de nos longues années d'études.

Un grand merci à tous les enseignants du département des sciences de la nature et de la vie de l'université (Université De Ghardaïa), pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiantes une formation actualisée

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A Allah

Tout d'abord tous les remerciements reviennent à Allah qui nous a aidé à mener à bien ce travail.

A ma très chère mère

Ma mère bellaouar khadidja qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous ses sacrifices et ses précieux conseils, pour toute son aide et sa présence dans ma vie, a reçu à travers ce travail, aussi humble soit-il, l'expression de mes sentiments et de ma reconnaissance éternelle.

A mon cher père

Mon père ABDALLAH qui est fier et qui trouve ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie, Puisse dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit Merci pour vos nobles valeurs, votre éducation et votre soutien continu.

A mes chères sœurs et frères

Pour leur soutien et leur présence à mes côtés, ils rendent nos vies heureuses.

En dernier lieu c'est à tout le reste de ma famille. Mes oncles, Mes tantes, mes cousins.

Pour mes chéries amies veuillez croire en notre profond respect et nos grandes amitiés,

Et TOUTE LA PROMOTION 2021/2022.

A tous les enseignants du département et surtout à mon

*Encadreur M^r. BAKELLI, qui m'encadré et guidé et mérite tous mon respect et tribut que je
.dédie ce travail*

*Enfin, A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je
vous dis MERCI.*

MAROUA

Dédicace

A Allah

A l'aide d'ALLAH tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie

A Mon Très Cher Père

Je vois en toi le courage l'amour et toutes les qualités requises chez un père ... Tu es mon soutien dans les moments difficiles, et la source intarissable de mon inspiration J'espère que tu trouveras dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour. Que dieu vous .garde et protège

A Ma Très Chère Mère

Je te remercie pour toutes les nuits dans lesquelles tu restais réveillée pour prendre

Soin de moi

Merci pour ton sourire qui est la lanterne qui éclaire mon chemin, pour tous les moments de bonheur que tu m'apporte quel que soit le terme et quel que soit L'expression, rien ne pourra .exprimer mon amour telle que mon coeur le ressent, que dieu te garde et te protège

A mes frères et mes sœurs

A mes Amies proches surtout mon collègue Maroua

A mon mari

A Mon Encadrant Mr. Bakelli

EN FIN A TOUTE LA PROMOTION 2021/2022 & A TOUTES PERSONNE QUI

A PARTICIPEE DE LOIN OU DE PRET POUR

.LA REALISATION DE CE TRAVAIL

AFAF

Résumé

La virulence, ou pathogénicité, constitue l'aptitude d'une bactérie à induire l'apparition d'une pathologie infectieuse. Plus l'agent pathogène est virulent, plus il est susceptible de provoquer une maladie particulière. Dans cet objectif, nous avons voulu d'estimer *in vitro* le degré de pathogénicité de six souches bactériennes potentiel à usage agricole, l'isolement été fait à partir d'un sol nu de régions de El Atteuf (Ghardaïa). Nous avons réalisé une série des tests biologiques traduit par d'une identification classique des souches étudiées (identifications macroscopiques, microscopiques et biochimiques), des tests enzymatiques (la recherche des enzymes lytiques, hémolytique, oxydase, catalase, protéase et coagulase) en plus la formation de biofilm et des tests de l'antibiogramme qui permet d'étudier le profil de résistance et de sensibilité de ces souches aux antibiotiques. Les résultats ont montré la présence de trois souches à Gram positive (S11, S32, TE23) et trois souches à Gram négatives (CMBU, SE19, SE6). Selon la littérature, les souches qui sont positives dans au moins 4 tests parmi les tests réalisés dans la présente étude sont éventuels d'être une souche pathogène. Sur les 6 souches, aucune n'a plus de 4 tests positifs. Mais la souche TE23 a 3 tests positifs avec une résistance modérée aux antibiotiques. Cela peut qualifier la souche d'être modérément dangereuse pour une utilisation humaine directe en tant que biofertilisant.

Mots clés : Virulence, Pathogénicité, *in vitro*, résistance, biofertilisant

الملخص

الفوعة، أو الإمبراضية، هي قدرة البكتيريا على إحداث مرض معدي. كلما زادت ضراوة العامل الممرض، زادت احتمالية تسببه في مرض معين. بهذا الهدف، أردنا تقدير درجة الإمبراضية لسنة عزلات بكتيرية محتملة للاستخدام الزراعي، معزولة عن التربة الجرداء في منطقة العطف ولاية غرداية في المختبر. أجرينا سلسلة من الاختبارات البيولوجية بما في ذلك التحديد الكلاسيكي للسلاسل المدروسة (التعريفات الماكروسكوبية والميكروسكوبية والكيميائية الحيوية) ، والاختبارات الأنزيمية مثل البحث عن إنزيمات التحلل، والأوكسيداز ، والكتلاز ، والبروتياز ، والإنزيمات المخثرة بالإضافة إلى تكوين الغشاء الحيوي ، و الاختبارات التي تسمح بدراسة مقاومة وحساسية هذه السلاسل للمضادات الحيوية. أظهرت النتائج وجود ثلاث سلالات موجبة الجرام (S11، S32، TE23) وثلاث سلالات سلبية الجرام (CMBU، SE19، SE6). وفقاً لمختلف الدراسات السابقة ومما نتج عن هذه الدراسة، من المحتمل أن تكون السلالات الإيجابية فيما لا يقل عن 4 من الاختبارات التي أجريت في الدراسة الحالية سلالة ممرضة. وعليه، من بين السلالات الست، لا يوجد أكثر من 4 اختبارات إيجابية لجميع العزلات. لكن السلالة TE23 لها 3 اختبارات إيجابية مع مقاومة معتدلة للمضادات الحيوية. مما قد يؤهل هذا السلالة لتكون خطيرة بشكل معتدل للاستخدام البشري المباشر كسماد حيوي.

الكلمات المفتاحية: الفوعة، الإمبراضية، في المختبر، المقاومة، التسميد الحيوي

Abstract

Virulence, or pathogenicity, is the ability of a bacterium to induce infectious disease. The more virulent the pathogen, the more likely it is to cause a particular disease. With this objective, we wanted to estimate *in vitro* the degree of pathogenicity of six potential bacterial isolates for agricultural use, isolated from bare soil in the region of El Atteuf (Ghardaïa). We performed a series of biological tests including classical identification of the strains studied (macroscopic, microscopic and biochemical identifications), enzymatic tests such as the search for lytic, hemolytic, oxidase, catalase, protease and coagulase enzymes in addition to biofilm formation, and antibiogram tests which allow the study of the resistance and sensitivity profile of these strains to antibiotics. The results showed the presence of three Gram positive strains (S11, S32, TE23) and three Gram negative strains (CMBU, SE19, SE6). According to the literature, strains that are positive in at least 4 of the tests performed in the present study are likely to be a pathogenic strain. Of the 6 strains, none has more than 4 positive tests. But strain TE23 has 3 positive tests with moderate antibiotic resistance. This may qualify the strain to be moderately dangerous for direct human use as a biofertilizer.

Key words: Virulence, Pathogenicity, *in vitro*, resistance, biofertilizer

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Les méthodes utilisées pour la détection du biofilm.	14
Tableau 2	Aspects morphologiques des isolats	27
Tableau 3	Résultats des tests réalisés.	31
Tableau 4	Résultats de l'identification des isolats par la galerie Api20E.	32
Tableau 5	Résultats d'identification par api 20° et MALDI-TOF	33
Tableau 6	Résultats de biofilm	34
Tableau 7	Résultats d'hémolyse.	35
Tableau 8	Résultats et interprétation de gamme 1	37
Tableau 9	Résultats et interprétation de gamme 2.	38
Tableau 10	Résultats et interprétation de gamme 3.	38

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Localisation de point du prélèvement des isolats de la région de Atteuf (Originale)	16
Figure 2	Repiquage des bactéries depuis les Eppendorf (Originale).	17
Figure 3	Une galerie api20e (biomérieux)	19
Figure 4	Méthode de remplisse api20E (bio Mérieux).	19
Figure 5	L'addition du plasma au l'écouvillon (originale)	22
Figure 6	Méthode du tube	24
Figure 7	Disposition des antibiotiques sur les boîtes	25
Figure 8	L'aspect macroscopique des colonies (6 souches) développant sur GN (originale).	28
Figure 9	Observation microscopique des isolats après la coloration de Gram (Microscope optique G×1000 sous immersion)	29
Figure 10	Coagulase négative pour tous les isolats (originale).	31
Figure 11	Activité protéolytique des isolats sur gélose au lait (2,5) protéase négative (originale).	32
Figure 12	Photographe des APi20E des isolats(originale).	33
Figure 13	Formation de biofilm parla méthode de tube (originale).	35
Figure 14	Exemples de phénotypes hémolytiques exprimés par les isolats testés (originale)	36
Figure 15	Profil de résultats de résistance et sensibilité aux antibiotique gamme1	39
Figure 16	Profil de résultats de résistance et sensibilité aux antibiotique gamme2	39
Figure 17	Profil de résultats de résistance et sensibilité aux antibiotique gamme3	40

Sommaire

Table de matière

Remerciement	I
Dédicace	II
Résumé	IV
ملخص	V
Abstract	VI
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Sommaire	IX
Introduction	1
Chapitre I : Partie bibliographique	
I. Virulence et PGPR	3
1. Définition	3
2. Virulence bactérienne	3
3. Régulation de virulence	3
4. Facteur virulente de PGPR	4
5. Espèces bactériennes potentiellement pathogènes pour l'homme présentes dans la rhizosphère	4
6. Niveaux de biosécurité	5
II. généralités sur la virulence de certains espèces bactériennes	5
1. Pouvoir pathogène	5
1.1. Modélisation des maladies bactériennes	5
1.2. Principe de pouvoir pathogène	6
1.3. Facteurs de virulence	7
2. Genre de <i>Klebsiella</i>	8

Sommaire

3. Genre de <i>Escherichia coli</i>	9
4. Genre de <i>pseudomonas</i>	9
III. Mécanisme de résistance aux antibiotiques	10
1. La résistance aux antibiotiques	10
2. L'origine génétique de la résistance	11
2.1. Résistance naturelle	11
2.2. Résistance acquise	11
3. Mécanisme d'action des antibiotiques	12
4. Médicaments antibactériens	12
IV. Biofilm microbien	13
1. Les biofilms et leur importance	13
2. La structure et la pathogenèse des biofilms microbiens	13
3. Techniques utilisées pour étudier les biofilms	14
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Isolement et purification des isolats	16
1.1. Isolement des isolats	16
1.2. Purification des isolats	16
2. Matériel de pratique	16
3. Repiquage et Ensemencement	17
4. Identification classique	18
4.1. Observation macroscopique	18
4.2. Observation microscopique	18
4.3. Identification par Galerie API20 ^E	19
4.4. MALDI TOF-MS	20

Sommaire

5. Tests enzymatiques	21
5.1. Catalase	21
5.2. Oxydase	21
5.3. Activité protéolytique	22
5.4. Coagulase	22
6. Test d'hémolyse	23
7. Formation de biofilm	23
8. Etude de la résistance des antibiotiques	24
8.1. Préparation d'inoculum	24
8.2 Application des disques d'antibiotique	25
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Identification bactérienne	27
1.1. Observation macroscopique	27
1.2. Observation microscopique	29
2. Caractérisation biochimique	30
2.1. Test mise en évidence :de catalase	30
2.2. Test mise en évidence de l'oxydase	30
2.3. Test de coagulase	30
2.4. Activité protéique	31
2.5. Identification par galerie Api20E et par MALDI-TOF	32
2.6. Potentiel de formation du biofilm	34
2.7. Test d'hémolyse	35
2.8. Antibiogramme	37
Discussion générale	41

Sommaire

Conclusion	44
Références bibliographiques	47
Annexes	53

Introduction

Introduction

Les termes pathogénicité et virulence sont utilisés dans de nombreuses disciplines scientifiques, notamment la médecine, l'épidémiologie, l'écologie évolutive, la microbiologie et la pathologie des plantes et des insectes. Les définitions de ces termes varient d'une discipline à l'autre et à l'intérieur d'une même discipline (Casadevall et Pirofski, 1999 ; Shaner et al., 1992). D'une manière globale, La pathogénicité constitue l'aptitude d'une bactérie à induire l'apparition d'une pathologie infectieuse.

Des études portant sur plusieurs souches ont montré qu'une bactérie peut être qualifiée comme pathogène humain opportuniste en raison de sa production des enzymes lytiques plusieurs destructeurs de tissus intestinaux ou non intestinaux, de production des exo-enzymes, en particulier les hémolysines, des phospholipases distinctes, de production des toxines induisant des vomissements et même de leur capacité à résister les antibiotiques commercial (Bottone, 2010).

Pour le but de réduire l'utilisation massive des engrais chimiques et des pesticides qui ont des effets négatifs sur la santé humaine et sur l'environnement, des microbes du sol, en particulier les bactéries qui ont la capacité à promouvoir la croissance des plantes ont été utilisés comme des biofertilisants depuis les années 1970. Ils ont été connus par leur capacité à solubiliser le Phosphore, potassium, le fer, à fixer l'azote et à contrôler biologiquement les maladies des plantes (Rovira et al., 1974 ; Bisen et al., 2015 ; Prakash et al., 2015 ; Manzanera et al., 2015).

Alors que la considération de la biosécurité environnementales et sanitaire suite à l'exploration et l'exploitation massive de ces matériels biologiques notamment les bactéries à effet PGP (bactéries favorisant la croissance des plantes) sont rarement évaluées. Ainsi, les tests de sécurité et l'évaluation des risques doivent devenir des pratiques standard, garantissant la sécurité du personnel exposé et la gestion des effets secondaires dangereux

L'utilisation accrue de ces nouveaux biofertilisants augmente le risque involontaire posé à la santé humaine par les pathogènes/allergènes opportunistes ne peut être ignoré (Keswani et al., 2016). Ces risques deviennent tout à fait bactériens lorsque les nouvelles souches isolées de PGPR/PGPB appartiennent aux différents genres qui englobe plusieurs agents pathogènes opportunistes comme *Serratia*, *Entérobactérie*, *Pseudomonas* et aux certaines espèces de groupe *Bacillus* comme *Bacillus cereus* (Berg et al., 2013).

L'objectif de notre étude est d'estimer le degré de pathogénicité des six souches bactériennes et le risque sanitaire pour l'homme quand leur usage agricole.

Chapitre I

Partie bibliographique

I. Virulence et PGPR

1. Définition

Le terme de virulence a une histoire conflictuelle parmi les pathologistes des plantes. La virulence est le degré de dommage causé à un hôte par une infection parasitaire (WB Wood, BD Davis 1980), supposé être négativement corrélé avec l'aptitude de l'hôte, et la pathogénicité est la capacité qualitative d'un parasite à infecter et à causer une maladie sur un hôte (HW Smith, 1977). La sélection peut agir à la fois sur la virulence et la pathogénicité, et leur changement dans les populations de parasites peut conduire à l'évolution du parasite et à la coévolution hôte-parasite.

2. Virulence bactérienne

Plus l'agent pathogène est virulent, plus il est susceptible de provoquer une maladie particulière, d'infecter un hôte particulier ou de nuire à d'autres organismes. L'unité de base de la virulence est appelée facteur de virulence. Un facteur de virulence est un produit bactérien, généralement une protéine, dont la présence augmente la capacité de l'agent pathogène à provoquer une maladie pendant l'infection d'un hôte approprié. Les facteurs de virulence sont le plus souvent des toxines protéiques sécrétées, des effecteurs protéiques injectés, les systèmes d'injection eux-mêmes, des protéines de surface qui engagent l'hôte d'une manière ou d'une autre, des facteurs qui protègent contre le système immunitaire, et des facteurs qui favorisent l'absorption de nutriments ou l'ajustement métabolique de l'hôte. Les facteurs de virulence s'opposent souvent directement à la tentative de l'hôte d'éliminer ou de tuer autrement la bactérie. Ces facteurs sont des cibles hautement prioritaires pour le développement de contre-mesures contre l'agent pathogène, y compris des vaccins. Les agents pathogènes bactériens peuvent être attribués à un seul ou à quelques facteurs de virulence. Le tétanos, par exemple, entraîne un dérèglement de la capacité du diaphragme à réguler la respiration, entraînant parfois la mort. Qui habite le sol et peut pénétrer dans l'organisme par une blessure. La maladie est entièrement causée par la production d'une seule toxine, la toxine tétanique. La vaccination avec une forme inactivée de la toxine est très efficace pour prévenir la maladie. À cet égard, la toxine tétanique est un exemple clair de facteur de virulence (AW Maresso, 2019).

3. Régulation de virulence

William Maresso dit Lorsque des bactéries pathogènes sont confrontées à la famine, à un changement des conditions de l'hôte ou à l'un des nombreux autres changements de l'hôte qui peuvent affecter leur survie, le microbe doit être capable d'ajuster son métabolisme pour répondre à ces changements. Les régulateurs sont les protéines qui assurent la médiation de cette conversion. En tant que tels, ces régulateurs relient un signal environnemental ou de l'hôte à la transcription de

l'ADN, fournissant ainsi un conduit par lequel le signal est converti en changements dans l'expression des produits génétiques impliquant le métabolisme ou la virulence. Les régulateurs contrôlent chaque bras majeur de la virulence, de l'adhérence à la production de toxines et aux systèmes de sécrétion.

4. Facteur virulente de PGPR

Les mécanismes par lesquels les organismes se fixent aux surfaces ont souvent été désignés comme des facteurs de virulence chez l'homme, les autres animaux et les plantes. Ces mécanismes peuvent être le résultat de sécrétions extracellulaires, de structures du système de sécrétion ou d'autres molécules qui permettent aux bactéries d'optimiser leur environnement. Les polysaccharides extracellulaires (EPS) sont l'un de ces facteurs. Les cellules bactériennes les sécrètent pour faciliter l'assemblage des communautés, la formation de biofilms et l'adhésion aux surfaces. Les EPS ainsi caractérisés comprennent l'alginate, la cellulose, la formation de locus de synthèse de polysaccharides (PSL) et de pellicules (PEL). Ces structures ont été identifiées dans des organismes associés à des maladies humaines comme *P. aeruginosa* mais aussi dans de nombreuses PGPR. Les systèmes de sécrétion permettent aux bactéries de s'engager directement avec leur environnement extracellulaire en offrant aux cellules des mécanismes de passage pour les enzymes et les protéines. Ces systèmes ont été associés à divers facteurs de virulence, car ils distribuent souvent des effecteurs et des molécules pathogènes (Singh et Sarma & Keswani, 2017).

5. Espèces bactériennes potentiellement pathogènes pour l'homme présentes dans la rhizosphère

De nombreuses bactéries étroitement liées à d'importants pathogènes nosocomiaux comme *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *B. cepacia* et *S. maltophilia* sont des colonisateurs de sol très importants. En outre, le sol abrite des espèces bactériennes qui ont été signalées comme étant à l'origine d'infections de la peau et des plaies (*Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* spp.), d'infections des voies urinaires (*P. vulgaris*, *B. cepacia*) et qui sont associées aux patients atteints de FK (*B. cepacia*, *P. aeruginosa*). Bien que ces données fournissent des preuves de la présence d'agents pathogènes opportunistes dans le sol, on dispose de très peu d'informations sur leur virulence par rapport à celle de leurs homologues cliniques. Par conséquent, l'évaluation du risque pour chaque souche est nécessaire et sera un objectif très important pour les microbiologistes à l'avenir. Par exemple, les souches pourraient être analysées pour la présence de déterminants de virulence spécifiques. (Van Loon *et al.*, 1998 ; Whipps, 2001).

6. Niveaux de biosécurité

La biosécurité décrit les procédures requises pour prévenir les pertes biologiques pour l'homme et l'environnement (Richmond et McKinney, 1999). L'organisation mondiale de la santé (OMS, 2015) a classé les agents infectieux (y compris les micro-organismes) en quatre niveaux de groupes de risque différents en fonction de leur pathogénicité pour la santé humaine adulte, de leur mode de transmission et de la disponibilité de mesures préventives et de traitements. Les seuils de niveau de biosécurité (BSL) indiquent les pratiques et les mesures de sécurité minimales conseillées pour la manipulation des différents groupes de risque de micro-organisme (Prakash, O., & Singh, H. B. (2019) :

- BSL-1 (risque individuel et communautaire faible) ;
- BSL-2 (risque individuel modéré et faible pour la communauté) ;
- BSL-3 (risque individuel élevé et risque communautaire faible) ;
- BSL-4 (risque individuel et communautaire élevé).

II. généralité sur la virulence de certains espèces bactérienne

1. Pouvoir pathogène

1.1. Modélisation des maladies bactériennes

Les chercheurs commençaient à prendre conscience d'un lien entre les maladies de contagion et la résistance de l'organisme à leur égard. La variole était une maladie virale qui présentait une mortalité élevée (plus de 50 % des personnes ayant contracté la maladie pouvaient y succomber) et était absurdement contagieuse. Sur la base d'observations (et de la tradition paysanne), le docteur Edward Jenner a été le premier à prouver systématiquement l'idée que la vaccination par la variole de la vache pouvait protéger de la variole. La variole de la vache était similaire à la variole, mais moins "virulente", et les gens pouvaient être vaccinés contre la variole, plus inquiétant (Mareeso,2019).

Pasteur a démontré de manière convaincante le concept d'atténuation en montrant que le passage d'une bactérie semblable au choléra réduisait régulièrement sa virulence. La forme atténuée pouvait être utilisée pour se protéger contre une maladie ultérieure causée par la forme plus virulente.

Friedrich Loeffler, un apprenti de Koch qui, en 1884, a observé "l'œdème, l'inflammation et le rougissement" des organes des animaux infectés, même si l'inoculation des bactéries s'est faite à distance et que les organes eux-mêmes ne contenaient pas de pathogènes observables. Cinq ans plus tard, Emil Roux et Alexandre Yersin démontreront que des animaux auxquels on a injecté des surnageants stériles d'une culture bactérienne (dans ce cas, *Corynebacterium Diphtheriae*) présentent des symptômes presque identiques à ceux de l'infection par diphtheriae elle-même. Avec cette découverte est né le domaine de la biologie des toxines, une discipline qui sera le fondement de notre compréhension des moyens moléculaires par lesquels les bactéries causent des maladies, (Maresso,2019).

1.2. Principe de pouvoir pathogène

Les bactéries pathogènes sont des bactéries capables de provoquer une infection chez des sujets sains après avoir pénétré dans un organisme vivant et modifié la structure cellulaire d'un ou plusieurs tissus différents. C'est ce qu'on appelle une maladie bactérienne infectieuse (Nichilin, 2000).

Selon (Pilet *et al.*, 1979 ; Pelmont, 1995 ; Cunningham, 1987 ; Chartier ,1998 ; le minor, 1993 ; pelmont, 1995) on a :

1.2.1. Les bactéries pathogènes

Ce sont des bactéries qui ont les propriétés spécifiques qui les rendent possibles Provoque une infection. Ces propriétés représentent des facteurs de virulence par ex : toxines, Hémolysine, l'adhésion....

Le potentiel pathogène est déterminé par l'espèce bactérienne responsable de la maladie, ainsi que par le type de maladie. Il s'agit d'un concept qualitatif, alors que la virulence est un concept quantitatif. De ce fait, à potentiel pathogène donné, il peut y avoir des souches plus ou moins virulentes Par exemple, *Shigella dysenteriae* et *Shigella flexneri* sont toutes deux responsables de dysenterie bactérienne, mais pas aux mêmes dosages. Avec *S. dysenteriae*, quelques bactéries suffisent à provoquer une maladie, mais avec *S. flexneri*, des centaines de milliers sont nécessaires.

En conséquence, cette espèce est considérée comme moins virulente que *S. dysenteriae*. Les bactéries pathogènes peuvent être retrouvées dans la flore commensale humaine (Le minor, 1993 ; Pelmont, 1995). Ils ne provoquent pas de maladie chez les personnes asymptomatiques ou immunodéprimées.

1.2.2. Bactéries opportunistes

Dans la plupart des cas, les bactéries opportunistes ne provoquent pas de maladie chez les individus en bonne santé. Ils peuvent cependant devenir pathogènes chez ceux dont le système immunitaire est affaibli. *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, sont quelques-unes des entérobactéries courantes retrouvées dans les matières fécales humaines et animales. Ces espèces ne sont pas nocives pour l'intestin, mais elles sont fortement impliquées dans les infections d'autres organes, notamment les infections urinaires (Pilet *et al.*, 1979 ; Le minor, 1993 ; Pelmont, 1995).

1.3. Facteurs de virulence

1.3.1. Adhésion

Adhésion aux cellules épithéliales muqueuses à l'aide d'adhésine pili ou non pili. Fimbria Adhésion se trouve dans fimbria. Cette adhésine est une molécule qui interagit avec les récepteurs des cellules hôtes. Dans le cas de l'adhésine non fimbria, la protéine se trouve dans la membrane externe de la bactérie. Dans certains cas (*E. coli* pathogène entérique), ce récepteur est sécrété par des bactéries dans le cytoplasme de la cellule hôte (Le minor, 1993, Cunningham, 1987 ; Chartier, 1998).

1.3.2. Les toxines bactériennes

Les agents pathogènes produisent de nombreuses substances qui sont toxiques pour l'hôte. En ce qui concerne les protéines, elles fonctionnent à de faibles concentrations et sont des toxines. Dans certains cas (comme le tétanos et le botulisme), seules les toxines sont pathogènes et la croissance microbienne ne contribue pas du tout aux symptômes observés (Kaiser, 1998 ; Cunningham, 1987 ; Le minor, 1993 ; Bharat, 1996 ; Aopoff, 1996).

1.3.3. Production d'hémolysine

L'hémolyse est un caractère très toxique prélevé sur des animaux de laboratoire. Ce trait, qui est porté sur un plasmide ou un chromosome, indique une pathogénicité réduite (Pelmont, 1995).

2. Genre de Klebsiella

2.1. Habitat

Le genre *Klebsiella* est isolé chez les humains et les animaux à sang chaud. Maladie ou porteur. L'espèce omniprésente est *K. Pneumoniae* et *K. oxytoca*, qui sont des hôtes normaux des voies respiratoires, en particulier du tractus gastro-intestinal, mais en petit nombre, Leur présence importante dans les tests de contamination fécale de l'eau. Il existe des espèces d'origine aquacole ou tellurique qui n'ont pas de pouvoir pathogène : *K. Planticole*, *K. Térigène* (Le mineur, 1993).

2.2. Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est la cause d'infections communautaires et d'infections À l'hôpital. Parmi les maladies infectieuses communautaires, K. Causée par une pneumonie Infections pulmonaires bronchiques, y compris pneumonie lobaire nécrosante et Abcès pulmonaire. Cette espèce est également à l'origine d'infections urinaires, Infections neuroméningées gastro-intestinales et post-traumatiques ou En postopératoire. Isolé principalement en réanimation, représentant 10% Infection nosocomiale [10].

2.3. Résistance aux antibiotiques

2.3.1. Résistance naturelle

Klebsiella pneumoniae est naturellement résistante à l'aminopénicilline (l'ampicilline, Amoxicilline) et à la carboxypénicilline (carbénicilline, ticarcilline) par production d'une bêtalactamase. Sensible aux antibiotiques qui agissent contre les bactéries Gram-négatives. Alors elle donne une conférence Résistance à tous les bêtalactamines. Ce mécanisme de résistance varie entre 5% et 40% selon le centre hospitalier (Amina boukhemis & Amina boutersa ,2015).

2.3.2. Resistance acquise

De nombreuses souches de *Klebsiella pneumoniae* produisent de la bêta-lactamase à large spectre d'activité (BLSE). *Klebsiella pneumoniae* a rencontré des bêta-lactamases à base de plasmide qui produisent des céphalosporinases chromosomiques. *K. pneumoniae* s'est récemment révélé résistant à la céfépime et à l'imipénème, La résistance à l'impuissance peut être liée à la présence d'un partenaire. Imperméabilité de la membrane externe et synthèse de haut niveau de bêta-lactamase produite par plasmide (Boukhemis et Boutersa ,2015).

3. Genre de *Escherichia coli*.

1. habitat

Cette bactérie potentiellement mortelle habite principalement l'intestin des vaches et des gens. Ceci explique qu'il soit principalement responsable d'empoisonnements alimentaires à tartiner à la viande hachée (Pierre. Marie Currie (2002-2003)).

2. Pouvoir pathogène naturelle

E. coli est le responsable des infections parentérales, urinaires, douleurs abdominales et septicémie avec endotoxine O et choc septique infectieux intestinal : La présence de diarrhée à *E. coli* est connue depuis les années 1940. Ce type de diarrhée est causé par des souches de sérotypes spécifiques qui provoquent des cas sporadiques ou petites épidémies (Abhijit A et al. 2013).

3. Résistance aux antibiotiques

3.1. Résistance naturelle

Escherichia coli est un type d'Enterobacteriaceae, comme toutes les bactéries Enterobacteriaceae. Résistance naturelle aux glycopeptides et à la pénicilline G. Il appartient au groupe 1. Les entérobactéries sont naturellement sensibles à toutes les β -lactamines (Saidani Maryline, 2012-2013).

3.2. Résistance acquise

Certaines souches ont acquis de nouveaux mécanismes de résistance qui les rendent évitez les antibiotiques. La résistance d'*E. coli* à la production de β -lactamines est due à des enzymes. Les antibiotiques sont inactivés en obtenant des enzymes. Trois principaux types d'enzymes inscrits : Pénicillinase, une enzyme appelée TRI (pour les inhibiteurs de résistance TEM) et céphalosporinase (Saidani Maryline, 2012-2013).

4. Genre de *Pseudomonas*

1. Habitat

La plupart des *Pseudomonas* sont répandus et isolés de l'eau (douce, saumâtre, mer), du sol, de la poussière en suspension dans l'air et des plantes. Les souches omniprésentes ont souvent une très grande diversité trophique et peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses

(Emmanuelle et El Amari, 2004 ; Botelho et Leda, 2006). Du fait de leurs voies métaboliques riches, ils sont souvent résistants à de nombreux conservateurs ou antibiotiques, ce qui explique leur fréquence croissante dans les hôpitaux, où ils peuvent être isolés des milieux humides (lavabos, siphons, vases, draps et articles de toilette), avec de l'eau, etc.). De nombreuses souches sont psychrophiles et peuvent altérer les aliments, les agents biologiques, les solutions injectables, le sang ou les dérivés sanguins réfrigérés (Ellis *et al.*, 2000).

2. Pouvoir pathogène chez l'homme

Certaines espèces du genre *Pseudomonas* sont des agents pathogènes, qui sont aussi *P. aeruginosa*. Explique pourquoi certaines des données sur *Pseudomonas* sont publiées dans des revues médicales (Wimalajeewa & Flett, 1985). Comme *Pseudomonas*, les humains se comportent comme des agents pathogènes opportunistes. Les espèces les plus importantes sont *P. aeruginosa* ou *Pseudomonas aeruginosa*, découverte par Gessard (1882). Chez les personnes immunodéprimées, il peut provoquer diverses infections de la peau et des organes internes, ainsi qu'une septicémie. Le risque d'infections nosocomiales (acquises par un traitement hospitalier) est particulièrement élevé. Elle survient dans la flore de transit de la peau et des muqueuses, provoque une surinfection des plaies et des brûlures, comme le montre la figure 1, et constitue une flore alternative ou sévère due à une introduction accidentelle dans l'organisme (catétisme, sondage, etc.). Diverses maladies infectieuses (Emmanuelle & El Amari, 2004).

III. Mécanismes de résistances des antibiotiques

1. La résistance aux antibiotiques

De la fin des années 1940 au début des années 1970, une multitude de molécules antibactériennes, naturelles et synthétiques, ont été découvertes. Le succès des premiers traitements anti-infectieux a conduit à une vision plutôt hautaine du problème des maladies infectieuses comme enfin résolu. Cependant, l'enthousiasme s'est rapidement estompé avec l'apparition des premières résistances antibactériennes chez les bactéries. Les bactéries ont su évoluer et résister plus ou moins rapidement à chaque nouvel antibiotique introduit en pratique clinique (Ploy *et al.*, 2005). Ces résistances peuvent avoir un spectre étroit, limité à un ou quelques-uns proposant une structure similaire, mais l'émergence de mécanismes de résistance liés à une variété de structures et de modes d'action s'est accrue ces dernières années (Walsh, 2000). Aujourd'hui, de véritables bactéries "monstres" résistantes à tous les antibiotiques font leur apparition.

2. L'origine génétique de la résistance et mécanisme de transmission génétique

La résistance bactérienne aux antibiotiques est héréditaire. Le gène de résistance est situé sur l'un des chromosomes (résistance chromosomique). Tout élément mobile tel qu'un plasmide, un élément transposable ou une intégrase (résistance ex chromosomique). La résistance peut être naturelle ou acquise (Mandell *et al.*, 2009).

2.1. Résistance naturelle

Les antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M, macrolides, rifampicine, acide fusidique, novobiocine, vancomycine) sont naturellement résistants aux bactéries Gram-négatives (dont *K.p* et *Pseudomonas aeruginosa*), qui ne peuvent pénétrer la membrane de la paroi. *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'amoxicilline, à l'ampicilline et à la ticarcilline, grâce à une lactamase codée par les chromosomes (Pina *et al.*, 2000). Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux acides aminés car le passage des acides aminés à travers la membrane cytoplasmique nécessite la présence d'un système de transport actif, qui n'est pas présent chez les bactéries anaérobies. Pour la même raison, les bactéries aéroanaérobies facultatives sont moins sensibles aux acides aminés dans les environnements pauvres en oxygène (Paul, 2005). Certaines espèces (*Klebsiella* spp, *Bacillus cereus*) produisent des β -lactamases naturellement (Paul, 2005).

2.2. Résistance acquise

L'acquisition de résistances est observée depuis le début de l'antibiothérapie, mais sa fréquence est faible. Enfin, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à la sélection de souches résistantes, et on constate aujourd'hui couramment qu'un grand nombre de souches ne réagissent pas à demander de la manière que leurs spectres d'activité le suggéreraient. Ce phénomène s'est développé au point où une seule identification bactérienne ne peut plus prédire comment une souche isolée réagirait aux antibiotiques (Ros, 1999 ; Meyer *et al.*, 2004).

3. Mécanisme d'action des antibiotiques

Selon Gaudy (2005), on pourrait bloquer d'une certaine manière la viabilité métabolique des bactéries sensibles, stopper leur développement, le plus souvent temporairement (effet bactériostatique), mais parfois définitivement (effet bactéricide). Les antibiotiques se présentent sous diverses formes, chacune ayant son propre mécanisme d'action contre les bactéries :

- Antibiotiques qui empêchent la paroi bactérienne de se synthétiser ;
- Antibiotiques qui modifient la perméabilité de la membrane plasmique ;
- Antibiotiques qui empêchent la synthèse des protéines ;
- Antibiotiques qui affectent le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs.

4. Médicaments antibactériens

Autant de découvertes, Paul Ehrlich, en 1908, a été le pionnier d'un concept utilisé aujourd'hui, la toxicité d'un produit chimique peut être modifiée avec précision afin de réduire ses effets toxiques sur les cellules de mammifères tout en restant mortelle pour les cellules bactériennes. C'est ainsi qu'est né le domaine de la chimiothérapie, où l'on conçoit des molécules qui ciblent spécifiquement la maladie.

C'est ainsi qu'est né le premier antibactérien commercialisé, le Salvarsan, créé par Alfred Bergheim, pour traiter la syphilis, une infection bactérienne sexuellement transmissible. L'élan de ces efforts allait plus tard donner naissance au domaine moderne de la chimie médicinale (Maresso,2019)

Felix de Herelle et Fredrick Twort décriront, indépendamment l'un de l'autre, respectivement en 1915 et 1917, les virus qui infectent les bactéries. Tout comme les cellules peuvent être infectées par un virus, les bactéries le peuvent aussi. L'infection des bactéries par certains bactériophages entraîne leur lyse, un processus qui donne naissance à de nouveaux descendants de virus. La découverte des bactériophages était considérée comme une percée médicale potentielle, un moyen efficace de traiter les infections bactériennes, Howard Florey et Ernest Chain parviendront finalement à synthétiser le produit chimique actif, celui de la pénicilline, en 1945, l'antibiotique allait protéger tous les types de personnes du péril bactérien. Mais presque aussitôt après sa découverte, les scientifiques ont reconnu que la pénicilline était également détruite par les bactéries (Maresso,2019).

IV. Biofilm microbien

1. Le biofilm et leur importance

La production de biofilm est inextricablement liée au QS (Fazli *et al.*, 2014). C'est un type de croissance microbienne caractérisé par l'attachement à une surface et la génération d'exopolysaccharides par les micro-organismes. Ces polymères de sucre vont encercler les cellules microbiennes qui les produisent, formant un protecteur. Outre les exopolysaccharides produits par les micro-organismes, le biofilm contient une variété de matériaux cellulotiques (ADN, lipides, protéines) qui façonnent sa structure et ses propriétés physico-chimiques (Wei et Ma, 2013).

Les biofilms peuvent être trouvés presque partout. Malgré le fait que les débuts de la microbiologie se concentraient sur l'étude de cultures pures de micro-organismes planctoniques, il est maintenant largement admis que la majorité des bactéries vivent dans des biofilms (Costerton *et al.*, 1978).

Des exemples de l'effet négatif de biofilm : Dans l'industrie alimentaire, la croissance du biofilm sur les équipements peut compromettre la qualité et la sécurité des produits (Winkelströter *et al.*, 2014). Les biofilms peuvent présenter un risque pour la santé dans les canalisations d'eau potable, en plus d'être impliqués dans la corrosion des tuyaux (Wingender et Flemming, 2011 ; Vargas *et al.*, 2017). Ils peuvent être bénéfiques dans certains cas (par exemple, ils peuvent être utilisés comme bio filtres pour le traitement de l'air et de l'eau) (Wani *et al.*, 1997 ; Cohen, 2001). Les biofilms sont également une source d'inquiétude majeure dans le domaine médical, car les micro-organismes pathogènes sont dirigés vers l'homme dans un environnement avec un grand nombre de personnes dont la santé est compromise (Costerton *et al.*, 1999).

Le biofilm de *Klebsiella pneumoniae* sont parmi les plus étudiés, Le succès pathogène de *K. pneumoniae* à provoquer des infections des voies urinaires et respiratoires peut être attribué à sa capacité à former des biofilms, en particulier sur les dispositifs médicaux à demeure (Hatt et Rather 2008). Vint poser l'hypothèse que la formation de biofilm chez *K. pneumoniae* contribuait à la persistance bactérienne, c'est-à-dire à une sensibilité réduite à la destruction par les mécanismes de défense innés de l'hôte (Murphy et Clegg, 2012).

2. La structure et la pathogenèse des biofilms microbiens

Les biofilms microbiens, qui sont des substances exopolymériques collantes (EPS) provoquant l'adhésion de micro-organismes à des surfaces biotiques telles que les cellules hôtes ou

abiotiques telles que les dispositifs médicaux, sont à l'origine d'une résistance aux antimicrobiens, en raison de leurs composants moléculaires tels que l'ADN électronique et les exoenzymes (β -lactamase, toxines, etc.), de la diffusion limitée des antimicrobiens à travers la matrice du biofilm, du contenu cellulaire persistant et de la limitation des nutriments et de l'oxygène. Les protéines de surface et les adhésions intercellulaires polysaccharidiques jouent un rôle dans la production et le développement du biofilm. Il est plus difficile de traiter les bactéries intégrées dans un biofilm que les formes planctoniques (Dhanasekaran, Thajuddin, 2016).

Les micro-organismes producteurs de biofilms sont à l'origine d'infections liées aux biofilms telles que les infections liées aux dispositifs à demeure et aux dispositifs médicaux comme les endocardites, les infections urinaires, les arthrites septiques, les rhinosinusites chroniques, les infections oculaires, les infections de plaies, etc. Les résultats du biofilm produit sur les dispositifs médicaux à demeure sont des infections récurrentes, impossibles à traiter et la défaillance du dispositif médical. Pour surmonter les infections chroniques et récurrentes, il est important de détecter les biofilms de micro-organismes, leur maturation et leur dispersion, et de déterminer l'activité anti biofilm et antibactérienne des agents contre le biofilm et les bactéries dans le biofilm (Dhanasekaran, Thajuddin, 2016).

3. Techniques utilisées pour étudier les biofilms

Plusieurs méthodes ont été utilisées par les microbiologistes cliniques pour détecter et mesurer les biofilms microbiens (Tableau 1).

Tableau 1 : Les méthodes utilisées pour la détection du biofilm.

Méthode	But
Méthode du tube (TM)	Détection qualitative en observant le biofilm aligné sur le fond et les parois du tube
Gélose au rouge Congo (CRA)	Détection qualitative en observant le changement de couleur des colonies
Plaque de microtitration (MtP)	Détection quantitative de biofilm par lecteur de microplaques (micro ELISA)
PCR en temps réel PCR conventionnelle PCR multiplex	Détection des gènes du biofilm

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Isolement des souches cibles

L'échantillonnage des souches a été effectué dans l'année 2020 à partir de trois échantillons des sols nus collectés de la vallée du M'Zab dans la commune d'El-Atteuf Wilaya de Ghardaïa (Figure 1). L'isolement a été réalisé par Monsieur BAKELLI Aïssa dans le laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.



Figure 1. Localisation de point du prélèvement des isolats de la région de Atteuf (google earth)

1.2. Purification et conservation des isolats

L'opération a été réalisée dans des conditions d'asepsie totale. À l'aide d'une anse en platine flambée au bec Bunsen, les colonies des bactéries sont repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélose nutritive. Ces colonies sont repiquées jusqu'à l'obtention de cultures pures et faciles à caractériser (Boudanga, 2011). Les isolats ont été, par la suite, conservés dans le glycérol 30% (v/v).

2. Matériel de pratique :

- **Les verreries** : boîte de Pétri, bécher, tube à essai, pipette graduée, flacons stériles, tubes à essai stériles, pipette pasteur, l'anse de platine, micropipette.
- **Les petits matériels** : vortex, bec bunsen, balance de précision. Balance électrique.

Agitateur-plaque chauffante, Microscope optique.

- **Les gros matériels** : Autoclave, étuve, hotte à flux laminaire.
- **Les échantillons** : 6 souches bactérienne (S11, S32, SE19, SE6, TE23, CMBU).
- **Milieux de culture** : La gélose GN, la gélose au lait, gélose Columbia au sang, la gélose Muller Hinton. Milieu LB.

3. Repiquage et Ensemencement

Après leur conservation, un repiquage a été réalisé selon la technique des quadrants ou épuisement de manière à obtenir des colonies bien isolées, à l'aide d'une anse en platine flambée au bec bunsen et dans des conditions totalement stériles, puis l'ensemencer sur la gélose nutritive, dans des boîtes de pétries par la méthode des stries, Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h.

Préparation de gélose GN : Milieu de la gélose nutritive (GN) est un milieu non sélectif contenant une base nutritive ordinaire que nous l'avons fait selon (Lapage & Mitchell, 1970).

(Extrait de viande 1,0g, Extrait de levure 3,0g, Peptone 5,0g, Chlorure de sodium 5,0g, Agar 15,0g, Eau distillée qsp1000ml).

Nous Suspensions 2.76 g dans 120 ml d'eau purifiée / distillée, après Chauffer à ébullition pour dissoudre complètement le milieu, après nous le Stériliser par autoclave à une pression de 15 lb (121 °C) pendant 15 minutes et verser de l'agar nutritif dans des boîtes de Petri (jusqu'à l'agar soit solidifié).



Figure 2. Repiquage des bactéries depuis les Eppendorf (**originale**).

4. Identification classique

4.1. L'observation macroscopique

Il s'agit d'un examen à l'œil nu ou à faible grossissement les boîtes de Pétri, vise à noter l'aspect des colonies bactérienne et à déterminer les caractères suivants : forme, relief, contour, consistance, taille, contour, opacité, couleur, L'examen macroscopique des cultures est effectué sur milieu GN, après 24h d'incubation.

4.2. Observation microscopique

L'examen morphologique des micro-organismes peut se faire à l'état frais, et après coloration :

4.2.1. Etat frais

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement des bactéries, Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle, L'observation se fait au microscope photonique.

4.2.2. Coloration de Gram

Afin de déterminer le type de Gram (positif ou négatif) des souches étudiées, on a suivi ces étapes :

- Fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laissé agir une minute (violet de gentiane)
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir une minute ;
- Rejeter le Lugol puis laver à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool 10 seconds ;
- Rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 1minute ;
- Rejeter la fuchsine, lavée abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres, et observer à l'immersion (G-1000) selon (Joffin *et al.*, 2006).

4.3. Identification par galerie API 20^E

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie tout dépend sur ces caractères biochimiques elle est réalisée par des galeries permettent une identification rapide des bactéries, exploitable avec des bases de données d'identification complètes, dont la plus connue est l'API 20E.

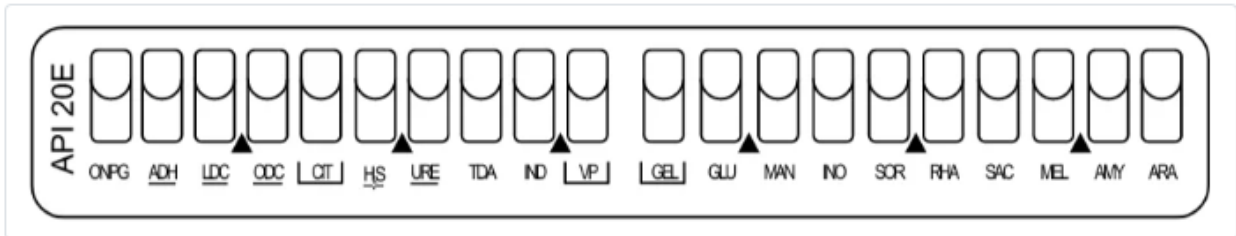


Figure 3. Une galerie api20e (biomérieux)

4.3.1. Préparation de la galerie

a. Préparation suspension bactérienne

Près de bec bunsen, à l'aide de l'anse de palatine nous faisons des colonies bactériennes Isolées Dans le tube contenant l'eau physiologique, après nous passons la suspension au vortex pour obtenir une solution parfaitement homogène. Puis nous Répartirons de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et déposons stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Après on Prenons une pipette pasteur et remplissez ces compartiments avec la suspension bactérienne comme suite :

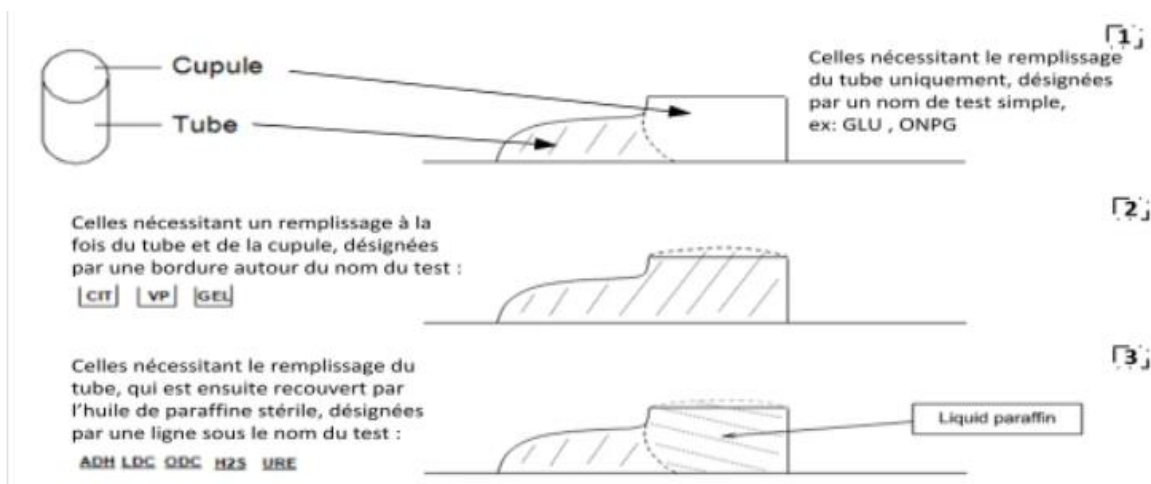


Figure 4. Méthode de remplisse api20E (biomérieux).

Après On passe les plateaux à Incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures, puis on ajoute des réactifs et observer les résultats (annexe 3).

4.4. MALDI TOF-MS

4.4.1. Principe

Les applications de la spectrométrie de masse sont très vastes et concernent principalement l'identification de peptides ou de protéines, l'analyse de leur séquence en acides aminés ou encore la mise en évidence de modifications post-traductionnelles. Cette technologie largement utilisée depuis longtemps, s'implante depuis quelques années en microbiologie (Gonçalves, Bertucci et *al.* 2007)

Le principe général du MALDI-TOF-MS est simple : des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique se déplacent, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge (m/z). La première étape consiste à mélanger l'échantillon à la matrice, l'évaporation des solvants conduisant à la cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Le mélange ainsi formé est déposé sur un support (plaque métallique. Une fois les échantillons déposés sur la cible, cette dernière est introduite dans le spectromètre de masse. Chaque dépôt est soumis à l'action du rayon laser UV. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes. Les ions ainsi formés, vont être mis en mouvement sous l'action d'un champ électrique, et l'analyseur va les séparer en fonction de leur rapport m/z . Les ions sont séparés selon leur temps de vol, ceux de petite taille atteignant les premiers le détecteur. Le temps de vol (time of flight) pour atteindre le détecteur est utilisé pour calculer la masse de chaque particule. La somme des ions analysés va former un spectre caractéristique de l'échantillon. Classiquement, l'axe des abscisses correspond au rapport masse sur charge (m/z) et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal (Carbonnelle and Nassif 2011).

4.4.2. Identification des cultures par MALDI- TOF-MS

L'identification a été réalisée dans l'année 2019, par Mr BAKELLI Aïssa, dans le laboratoire en Turquie.

5. Tests enzymatiques

5.1. Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes, aéroanaérobies Facultatifs. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé au cours des réactions d'oxydation. Cette enzyme catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon la réaction (Harley et Prescott, 2002).

5.1.1. Technique

Sur une lame propre, nous déposons une colonie prélevée à l'anse et Ajoutons une goutte d'eau oxygénée, On Observer immédiatement le résultat :

- Apparition de bulles d'oxygène, l' H_2O_2 est donc dégradé en H_2O et O_2 , La bactérie Possède une catalase, elle est dite catalase (+).
- Pas d'apparition de bulles d'oxygène, elle est dite catalase (-).

5.2. Oxydase

Ce test est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C. (Joffin et Leyral, 2006). A l'aide d'une pipette Pasteur stérile la bactérie à identifier est prélevée et déposée sur le papier filtre humecter du réactif (Réactif oxydase) composé de phénylénediamine.

- Après 30 secondes, Une coloration violette signe une oxydase positive.
- Pas de coloration ou décoloration signe une oxydase négative.

5.3. Activité protéolytique

Les enzymes qui permettent la dégradation de composés protéiques, de Polypeptides ou d'acides aminés sont recherchées sur des milieux spécifiques, Nous recherchons la protéase sur la gélose au lait :

Nous Prélevons à l'aide de l'anse de platine une fraction d'une colonie, puis l'ensemencer sur la gélose au lait par la méthode des stries, Après l'incubation de 24h Le protéolyse est indiquée par l'apparition de zones claires autour des stries. (Frazier, 1926).

Gélose au lait (Marshall, 1992)100 ml : on agite 4 g de lait écrémé (poudre) +40ml eau distillé Mélanger avec 60ml de GN (déjà préparé) Après l'autoclave, laisser refroidir et Verser Dans des boites de Petri (jusqu'à ce que l'agar soit solidifié).

5.4. Coagulase

La coagulase est une protéine semblable à une enzyme qui provoque la coagulation du plasma en convertissant le fibrinogène en fibrine, nous avons besoin des matériels suivant : écouvillons, sang (tube citrate), Centrifugeuse, échantillons (les isolats), bec bunsen.

Près de la flamme, à l'aide de tige de l'écouvillon nous faisons des colonies bactériennes Isolées, en ajoute 1ml de plasma, après Plaçons les écouvillons dans un incubateur à 37 °C pendant 24h.



Figure 5 . L'addition du plasma au l'écouvillon (originale).

Résultats possibles :

- Plasma de sang liquide : La bactérie n'a pas l'enzyme coagulase.
- Plasma de sang solide : La bactérie a l'enzyme coagulase.

6. Test d'hémolyse

L'étude du caractère hémolytique des isolats en utilisant la base nutritive une gélose Columbia au sang.

Gélose Columbia selon Marshall : (Mélange de peptone 18 g, extrait de levure 5g, amidon de maïs 1 g, Chlorure de sodium 5 g, Agar 10 g, Eau distillée qsp 1 L)

Pour notre travail on a préparé une quantité de 60ml. Après l'autoclave, on ajoute le sang et verse dans des boîtes de Petri (jusqu'à ce que l'agar soit solidifié).

Nous ensemencions les colonies par la méthode de strie et incubons pour 24h. Les résultats reposent sur l'aspect du milieu autour des colonies.

7. Formation de biofilm

Nous utilisons la méthode du tube qui est un test qualitatif pour la détection du micro-organisme producteur de biofilm, à la suite de l'apparition d'un film visible.

Les souches sont inoculées dans un tube à essai en polystyrène contenant du milieu LB et incubées pendant 24 h à 37°C, après nous faisons 3 rinçages à l'eau physiologique, puis nous utilisons la coloration avec du cristal violet et laissons pendant 30 minutes, après nous faisons encore 3 rinçages à l'eau physiologique.

Après le séchage à l'air du processus du tube à essai, l'apparition d'un film visible recouvrait les parois et le fond du tube indique la production de biofilm.

Préparation de Milieu LB selon Lennox : (Tryptone 10g, Extrait de levure 5g, Sodium chlorure 5g, Agar 15g, Eau distillée 1L) puis Autoclave 15 minutes à 121 °C.

Préparation de l'eau physiologique pour le rinçage : Eau distillée 360ml + NaCl 3.24 g.



Figure 6. Méthode du tube (**originale**).

8. Etude de résistance de antibiotiques

Un antibiogramme est une technique de tester la sensibilité d'une Bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. En utilisons la gélose Muller Hinton coulée en boîtes de pétri.

8.1. Préparation d'inoculum :

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, nous utilisons un écouvillon pour prélever facilement les colonies bactériennes, Bien déchargeons l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, et Homogénéisons la suspension bactérienne en utilisant vortex.

L'ensemencement se fait par écouvillonnage (méthode de Kirby) : en Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées en 3 passages en faisant pivoter de 60° sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de gélose.

Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose avec une pince métallique stérile.

Les boîtes sont incubées 24 h à 37°C.

8.2 Application des disques d'antibiotique :

Nous avons utilisé 20 antibiotiques, répartis en trois gammes en Déposons à la pince stérile un disque de chaque antibiotique de manière espacée (figure7).

Lecture des Résultats : Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du la zone d'inhibition circulaire qui entoure le disque d'antibiotique : souche sensible, intermédiaire ou résistante.

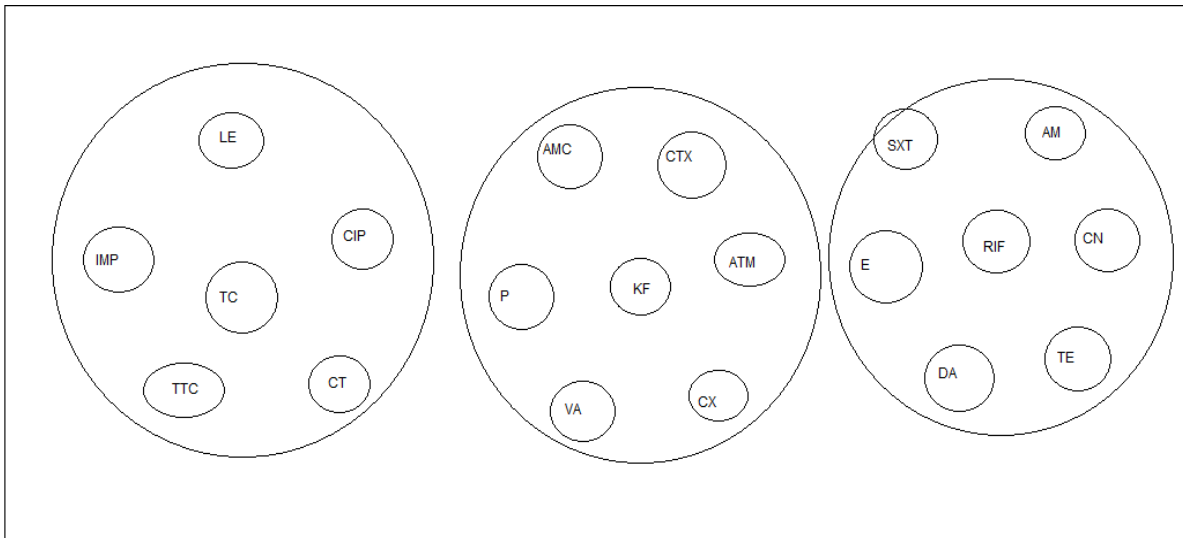


Figure 7. Disposition des antibiotiques sur les boîtes d'antibiogrammes (**originale**)

Chapitre III

Résultats et discussion

Résultats

1. Identification bactérienne

1.1. Analyse macroscopique

L'aspect des colonies bactériennes développées sur gélose nutritive après incubation de 24 heures à 37°C est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 2. Aspects morphologiques des isolats

Souches	Forme	Relief	Contour	Taille	Opacité	Couleur	Consistance
S32	Rond	Plat	Régulier	17 mm	Translucide	Beige	Sec
S11	Rond	Bombé	Régulier	2-3 mm	Opaque	Beige	Sec
CMBU	Rond	Bombe	Régulier	3 mm	Opaque	Beige	Muqueuse
TE23	Rond	Bombé	Régulier	13 mm	Translucide	Beige	Muqueuse
SE19	Rond	Plat	Régulier	1-3 mm	Translucide	Beige	Sec
SE6	Rond	Bombe	Irrégulier	3-5 mm	Translucide	Beige	Muqueuse

Les colonies des souches isolées ont généralement une forme circulaire, élevée, à bords réguliers, parfois irrégulière, La taille est variable entre petite et moyenne, la texture est toujours muqueuse, sauf pour S32, S11 et SE19 qu'a une texture sèche. La couleur observée est beige pour pratiquement toutes les souches (Figure8).

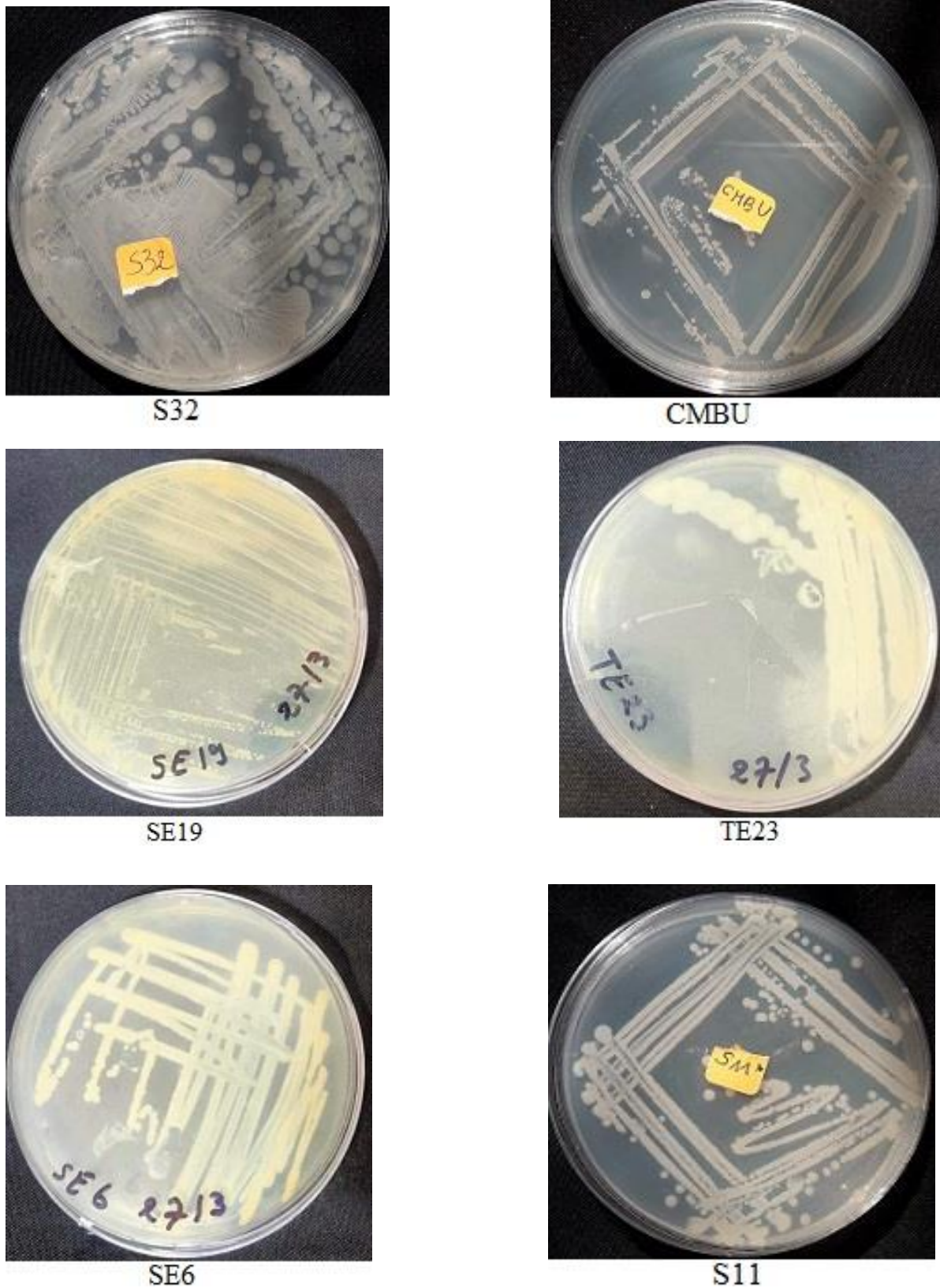


Figure 8. L'aspect macroscopique des colonies (6 souches) développant sur GN (originale).

1.2. Observation microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram permet de révéler la forme, le type de Gram et le mode de regroupement des cellules des souches isolées.

Les observations révèlent des bacilles à Gram positif (TE23, S11, S32) et des bacilles à Gram négatif (SE6, SE19, CMBU) regroupé en chaîne ou en chaînette selon les souches (figure7).

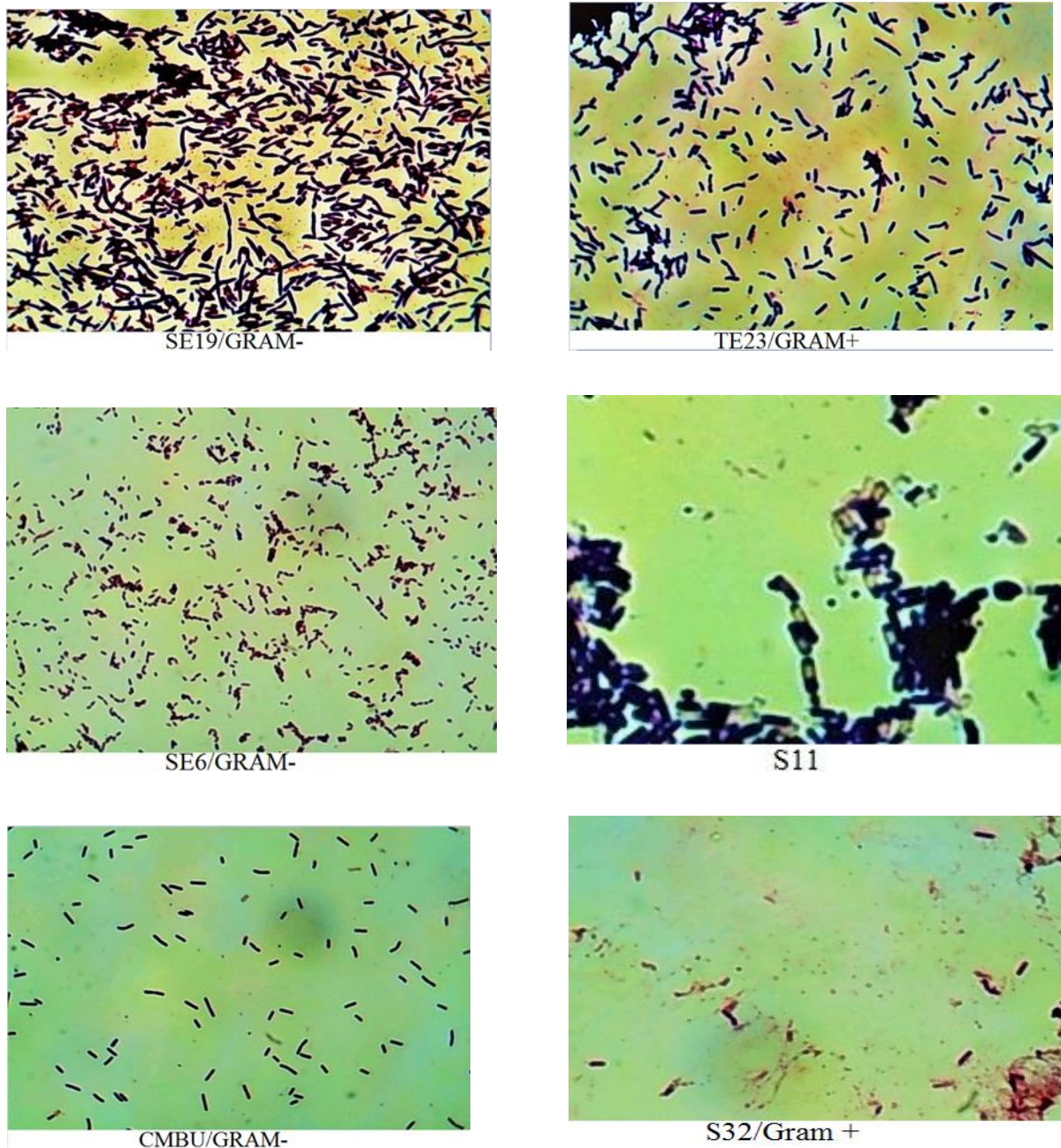


Figure 9. Observation microscopique des isolats après la coloration de Gram (Microscope optique G×1000 sous immersion) (**originale**).

2. Caractérisation biochimique

2.1. Test de mise en évidence de la catalase

Les résultats du test de la catalase pour l'étude du type respiratoire ont montré que les souches isolées sont catalase variées, dont S32, CMBU sont de catalase négative tandis que S11, TE23, SE6, SE19 sont de catalase positive la réaction se traduit par le dégagement immédiat de H₂O₂ est il y a dégagement des bulles d'oxygène (Tableau 2).

Les résultats montrent que les souches S32, CMBU sont dépourvus de l'enzyme catalase tandis que les souches SE6, SE19, TE23 et S11 produisent l'enzyme de catalase qui facilite la désintoxication cellulaire. La Catalase neutralise les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène et sa concentration dans les bactéries a été corrélée avec la pathogénicité (Reiner,2010).

2.2. Test de mise en évidence de l'oxydase

L'oxydase est l'un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles à Gram négatif. Une réaction oxydase positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée (Harkat, & Arabi (2021).

Les résultats du test d'oxydase montrent que la majorité des souches analysées SE6, TE23, S11, S32, CMBU sont Oxydase négatif sauf pour la souche SE19 qui a présenté une réaction oxydase positif (Tableau 3).

2.3. Test de coagulase

La coagulase est une enzyme capable de coaguler le plasma sanguin. La mise en évidence d'une activité coagulase où est généralement utilisé chez une souche de *Staphylococcus* est un des critères d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine. D'autres germes, moins courants en pathologie humaine, Pour déterminer son effet sur la coagulation du sang humaine, nous avons trouvé que aucune souche n'a eu de résultats positifs et aucun caillot n'est observé (Figure 8).

2.4. Activité protéique

L'enzyme protéase qui permettent la dégradation de composés protéiques, de Polypeptides ou d'acides aminés Les résultats montrent que les souches (S11, TE23, CMBU, S32) ont démontré des zones claires autour de strie d'inoculation sur la gélose au lait écrémé. Ce qui indique que ces souches ont une activité protéase positive tandis que les souches SE6, SE19 n'a pas présenté une zone claire, ce qui signifie que les deux souches n'ont pas une activité protéase. (Figure 9).

Tableau 3. Résultats des tests réalisés.

Souches	Catalase	Oxidase	Coagulase	Protéase
S32	-	-	-	+
S11	+	-	-	+
TE23	+	-	-	+
CMBU	-	-	-	+
SE6	+	-	-	-
SE19	+	+	-	-



Figure 10. Coagulase négative pour tous les isolats (originale).

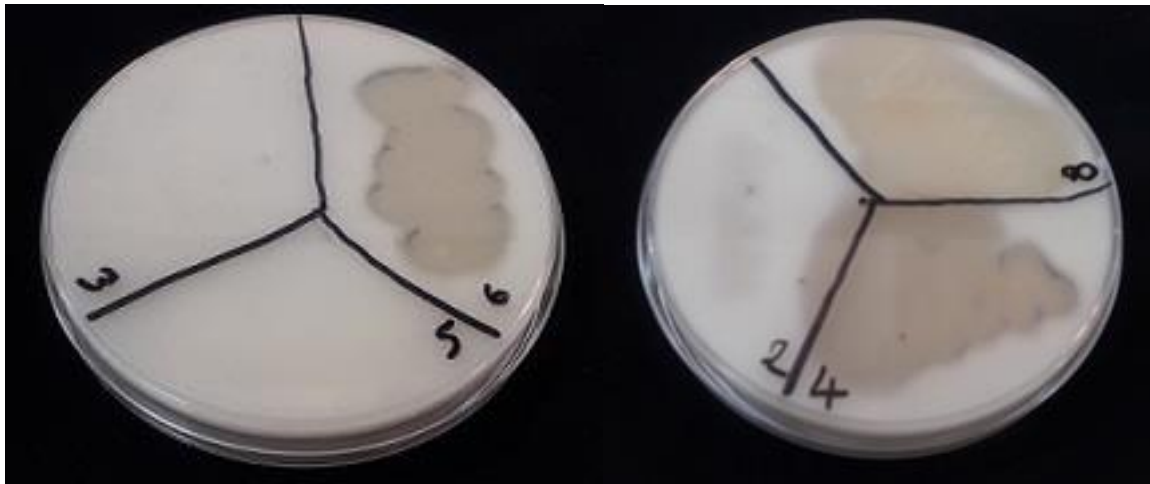


Figure 11. Activité protéolytique des isolats sur gélose au lait SE6, SE19 (2,5) protéase négative (originale).

2.5. Identification par galerie Api20E et par MALDI-TOF

Le test d’identification par les galeries API 20E est réalisé dans le but d’identifier les bactéries à Gram négative a priori les Entérobactéries. Selon les résultats enregistrés les souches SE6, SE19 ont été identifiées comme *Enterobacter* sp et *Pantoea* sp. Ces résultats ont été bien confirmés par l’analyse réalisée par MALDI-TOF. Ou les souches ont été enregistrées comme *Klebsiella*.sp, pour SE6 et *Pantoea agglomerans* pour la souche SE19.

Pour les autres souches à Gram positive et la souche CMBU, les résultats enregistrés par MALDI-TOF sont présentés dans le (tableau5) Les résultats d’identification de API20E par le logiciel de biomérieux est indiquée dans annexe 2.

Les résultats des différents caractères biochimiques des souches sont présentés dans Le tableau 4, figure 13.

Tableau 4. Résultats de l’identification des isolats par la galerie Api20E.

Souche	ONP G	A D H	L D C	O D C	C I T	H 2 S	U R E	T D A	I N D	V P	G E L	G L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A
SE19	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
CMBU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SE6	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 5. Résultats d'identification par API20E et MALDI-TOF.

Souche	l'organisme	Score	API 20E
SE6	<i>Klebsiella. Sp</i>	2.01	<i>Enterobacter</i>
SE19	<i>Pantoea agglomerans</i>	/	<i>Pantoea spp 2</i>
TE23	<i>Bacillus cereus</i>	2.25	/
S32	<i>Bacillus subtilis</i>	2.24	/
S11	<i>Bacillus endophyticus</i>	1.85	/
CMBU	<i>Clavibacter miheganensis</i> subsp. <i>meheganensis</i>	/	<i>Non-fermenter spp</i>



SE19



CMBU



SE6

Figure 12. Photographie des API20E des isolats (originale).

2.6. Potentiel de formation du biofilm

Une observation qualitative de la formation de biofilm dans les tubes à essai inoculé par les souches cibles. La lecture des résultats a été introduit selon la quantité de biofilm coloré par le violet de gentiane ont faible pour les tubes faiblement coloré, modéré pour les tubes moyennement coloré et élevé pour les tubes fortement coloré. Les résultats sont bien enregistrés dans le tableau 6.

Tableau 6. Résultats de biofilm.

Isolats	Potential de biofilm
TE23	Élevé
SE6	Modéré
S32, CMBU, S11, SE19	Faible

Le tube à essai (TE23) a montré une forte coloration par le violet de gentiane ce qui a été interprété par la forte production de la biofilm par cette souche (TE23). La souche (SE6) a présenté une coloration moyenne voir faible par le violet de gentiane. Ce qui nous a permis de considérer que cette souche est une productrice moyenne de biofilm. Les tubes des autres souches (S11, S32, CMBU, SE19) n'ont pas mentionné une coloration distinguée par le violet ce qui a été considéré comme une faible production voir non productrice de la biofilm. (Figure14).

De nombreuses maladies infectieuses chez l'homme sont causées ou exacerbées par les biofilms. La carie dentaire est un excellent exemple de maladie dépendante du biofilm, résultant des interactions entre les micro-organismes, les facteurs de l'hôte et le régime alimentaire (sucres), qui modulent la formation dynamique de biofilms sur les surfaces dentaires. Tous les biofilms ont une matrice extracellulaire d'origine microbienne comme constituant essentiel (Gonçalves,2007).



Figure 13. Formation de biofilm par la méthode de tube (**originale**).

2.7. Test d'hémolyse

Une réaction β -hémolytique implique une lyse complète des globules rouges, provoquant une zone claire sur la gélose entourant la colonie et on parle d'hémolyse vraie. D'autre part, une réaction α -hémolytique se produit lorsque l'hémoglobine des globules rouges est réduite en méthémoglobine, provoquant une décoloration verdâtre sur la gélose entourant les colonies. Enfin, l'absence d'hémolyse ou de décoloration est appelée γ -hémolyse (Buxton, 2005).

Les résultats obtenus ont montré que les souches bactériennes testées présentaient les trois phénotypes (Figure 15). Où, toutes les souches ont des résultats positifs sauf que le souche SE19 qui n'a pas d'hémolyse. Les souches S11, S32, TE23, SE6 ont présenté une réaction hémolytique de type alpha et CMBU a présenté une réaction de type gamma. Les résultats sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7. Résultats d'hémolyse.

Souches	Hémolyse	Type
S11	+	Alpha
S32	+	Alpha
TE23	+	Alpha
CMBU	+	Beta
SE19	-	Gamma
SE6	+	Alpha

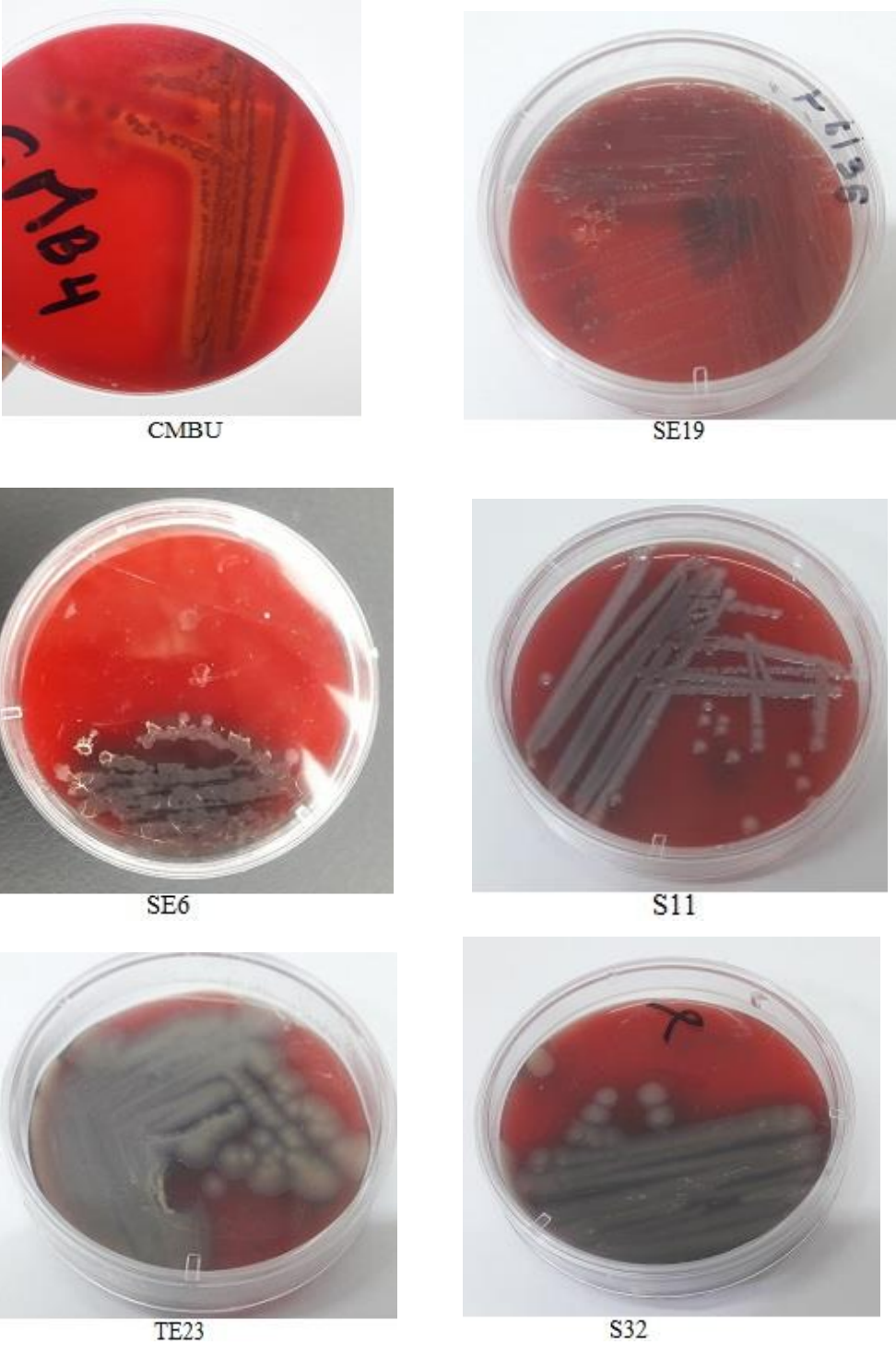


Figure 14. Exemples de phénotypes hémolytiques exprimés par les isolats testés (originale).

2.8. Antibiogramme

Les résultats obtenus d'utilisation de 3 gammes d'antibiotiques et l'interprétation (résistant R, intermédiaire I, sensible S) sont résumés dans les tableaux .8.9.10, figure 16,17,18.

Tableau 8. Résultats et interprétation de gamme 1.

Antibiotique	Lévofloxacine	Ticarcilline	Ticarcilline + acide clavulanique	Ciprofloxacine	Imipenème	Céfotaxime
CHARGE	5	75	85	5	10	1000
Souches	Diamètre et interprétation					
S11	20 S	<6 R	<6 R	25 S	20 S	10 I
S32	30 S	22 S	25 S	32 S	30 S	<6 R
CMBU	30 S	28 S	27 S	30 S	29 S	<6 R
TE23	27 S	12 I	12 S	25 S	20 S	<6 R
SE6	23 S	20 S	18 S	32 S	10 I	10 I
SE19	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R

Tableau 9. Résultats et interprétation de gamme 2.

Antibiotique	Kanamycine	Céfotaxime	amoxicilline +acide clavulanique	Aztréonam	Céfuroxime	Benzylpénicilline	Vancomycine
CHARGE	30	30	30	30	30	10	30
Souches	Diamètre et interprétation						
S11	<6 R	10 I	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	15 I
S32	38 S	30 S	10 I	<6 R	25 S	10 I	19 S
CMBU	40 S	25 S	19 S	<6 R	26 S	14 I	18 S
TE23	10 I	15 I	<6 R	<6 R	11 I	<6 R	14 I
SE6	15 I	20 S	15 I	30 S	<6 R	<6 R	<6 R
SE19	18 S	21 S	18 S	30 S	18 S	<6 R	<6 R

Tableau 10. Résultats et interprétation de gamme 3.

Antibiotique	Doxycycline	Érythromycine	Tétracycline	Triméthoprim	Ampicilline	Rifampicine	Céfaléxine
Charge	2	15	30	25	10	5	10
Souches	Diamètre et interprétation						
S11	25 S	30 S	20 S	15 I	<6 R	15 I	24 S
S32	22 S	30 S	30 S	32 S	20 S	28 S	22 S
CMBU	20 S	27 S	30 S	26 S	17 S	16 I	20 S
TE23	25 S	15 I	25 S	10 I	<6 R	15 I	25 S
SE6	<6 R	<6 R	20 S	25 S	<6 R	<6 R	20 S
SE19	14 I	16 I	26 S	20 S	<6 R	16 I	24 S

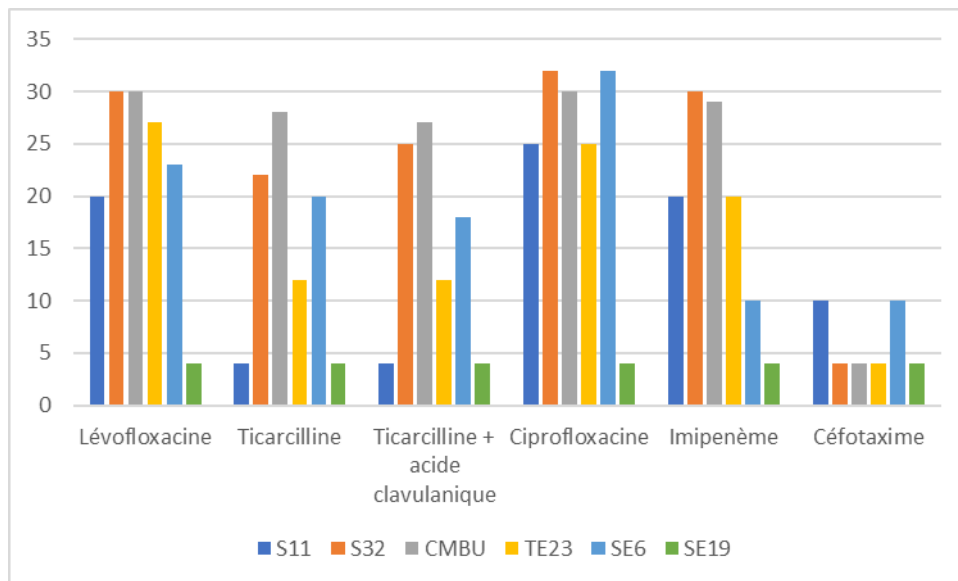


Figure 15. Profil de la résistance et sensibilité des six souches aux antibiotiques de gamme 1.

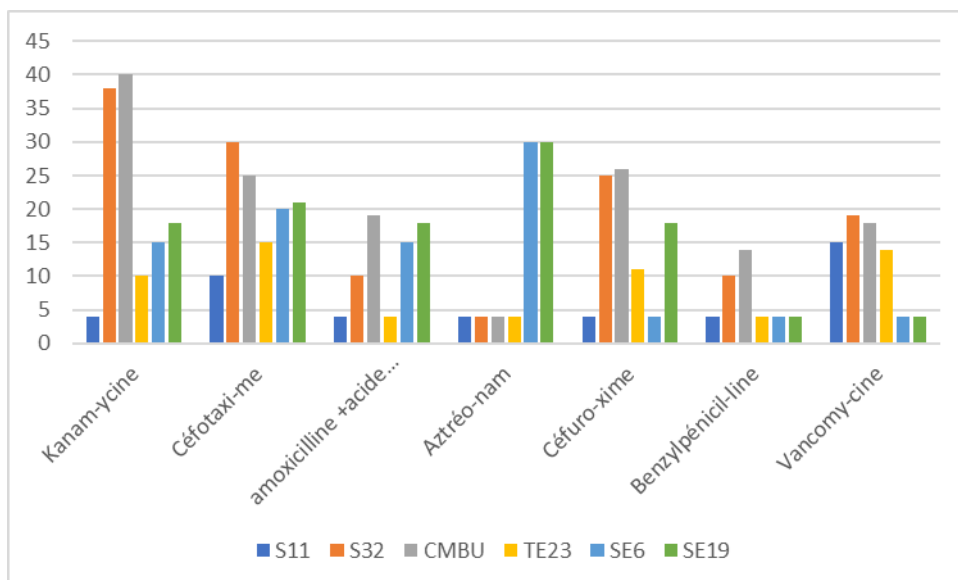


Figure 16. Profil de la résistance et sensibilité des six souches aux antibiotiques de gamme 2.

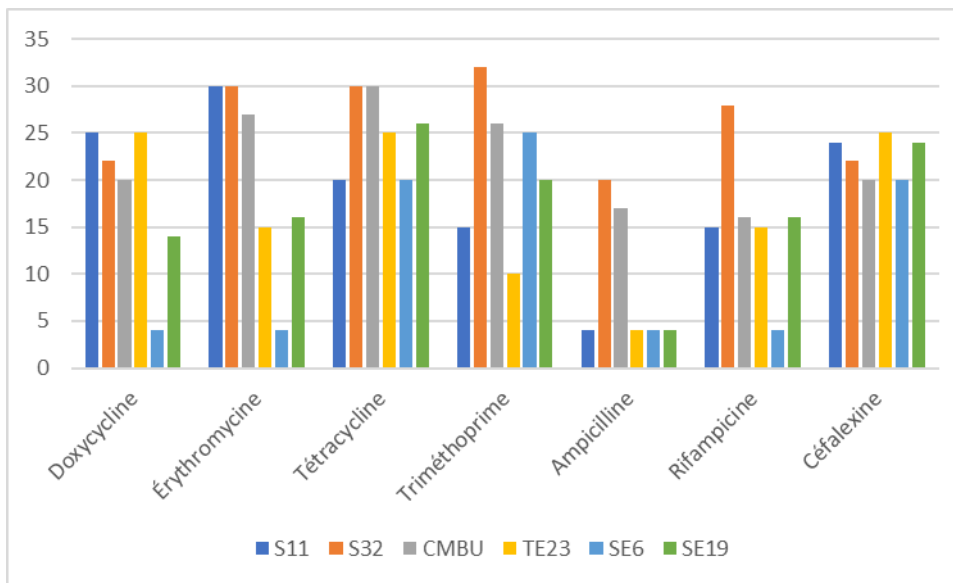


Figure 17. Profil de la résistance et sensibilité des six souches aux antibiotiques de gamme 3.

Interprétation des résultats

Résistance des souches aux β -lactamines

D'après nos résultats, majorité des souches sont résistante à l'ampicilline sauf que S32, CMBU qui y étaient sensibles en plus de aminopénicilline et résistant au monobactame, on a aussi remarqué que toutes les souches sont sensibles au carbapénème et céphalosporine.

Résistance des souches aux Quinolones

Toutes les souches ont sensible au Fluroquinone à l'exception de SE19 où y était résistant à 100%.

Résistance des souches aux Aminosides et macrolides

D'après notre étude toutes les souches sont sensibles à macrolide sauf que la souche SE6 qui y était intermédiaire, comme pour aminosides les souches S32, SE19, SE6, CMBU ont sensibles, la souche TE23est intermédiaire tandis que la souche S11 est résistant à 100%.

Résistance des souches aux Glycopeptides

D'après nos résultats, les souches isolées sont résistantes à la vancomycine tel que SE6, SE19.

Résistance des souches aux sulfamides

D'après les résultats il y a aucune souche résistante, les souches sont sensibles du sulfamide sauf que la souche TE23 qui a un effet intermédiaire.

La résistance de souche SE6 se rapproche de l'étude menée par HAMDAN et al, 2011 qui montre des résistances importantes des souches de *K. Pneumoniae* aux bêtalactamines, à l'amoxicilline et à l'amoxicilline + acide clavulanique.

L'étude des propriétés des souches nous a conduit à distinguer des souches présentant des antibiorésistances variées dont toutes les souches à une sensibilité à certains antibiotiques et qui montrent même si l y a une irrégularité il y avait un médicament qui indique qu'ils n'ont pas nocif sur la santé humaine.

Discussion générale :

Les résultats ont montré la présence de trois souches Gram positives (S11, S32, TE23) et trois souches Gram négatives (CMBU, SE19, SE6).

Dans la présente étude on a trouvé que les souche S11, S32, TE23, CMBU productrice de protéase et tous ont de coagulase négatif qui est considéré comme un facteur de virulence risqué pour l'homme et responsable de maladies laryngologiques. (Michalik, M. (2020).

De nombreuses maladies infectieuses chez l'homme sont causées ou exacerbées par les biofilms. Dans la présente étude on a que TE23 et modérément SE6 produisant de biofilm. Tous les biofilms ont une matrice extracellulaire d'origine microbienne comme constituant essentiel (Gonçalves,2007). Un exemple de maladie dépendante du biofilm, La carie dentaire résultant des interactions entre les micro-organismes, les facteurs de l'hôte et le régime alimentaire (sucres), qui modulent la formation dynamique de biofilms sur les surfaces dentaires.

La production d'hémolysine est associée à la pathogénicité de l'organisme (Johnson, 1991). Dans la présente étude, majorité Des souches ont produit de l'hémolysine. La production d'hémolysine comme facteur de virulence par des souche uropathogènes a été démontré par des chercheurs (Johnson, 1991). Il a été suggéré que la colonisation de l'organisme par des souches hémolytiques est plus susceptible de se transformer en infections des voies urinaires.

Selon la littérature, les souches qui sont positives dans au moins 4 tests parmi les tests réalisés dans la présente étude sont éventuels d'être une souche pathogène. Sur les 6 souches, aucune n'a plus de 4 tests positifs. Mais la souche TE23 a 3 tests positifs avec une résistance modérée aux antibiotiques Ce qui est confirmé par Maldi-TOF comme *Bacillus cereus*, qui est connu pour provoquer des infections cliniques, des intoxications alimentaires et des syndromes diarrhéiques et émétiques induits par des toxines (Andersson, M. A., (1998)..

Cela peut qualifier la souche TE23 d'être modérément dangereuse pour une utilisation humaine directe en tant que biofertilisant.

Conclusion

Conclusion

Des nombreux chercheurs se focalisent sur l'action des microorganismes pour réduire l'usage des engrais chimiques. À ce titre, l'utilisation des PGPR/PGPB sont très intéressantes pour l'application en agriculture comme biofertilisants et biopesticides, ils jouent un rôle très important dans le maintien de la fertilité des sols tout en réduisant le coût des engrais chimiques pour un meilleur rendement agronomique à l'échelle mondiale.

Les PGPR sont largement supposés être des candidats plausibles pour l'agriculture durable, il devient donc crucial que ces microbes n'aient aucune forme d'effets délétères sur les environnements locaux ou la santé humaine. Ainsi, le moment est venu d'intégrer de nouvelles méthodes de sélection pour étudier les risques de biosécurité des nouvelles souches destinées pour une libération dans l'environnement de manière responsable, afin d'assurer la sécurité des humains et des écosystèmes dans le développement du produit au future.

Cette étude avait pour objective d'évaluer et d'estimer le risque et le degré de pathogénicité de six bactéries potentiel à usage agricole isolée à partir d'un sol saharienne nu. Ainsi l'étendue de leurs dangers pour l'explorateur au niveau de laboratoire et l'utilisateur au niveau de champ agricole telles que la résistance aux antibiotiques.

Pour cet objectif, nous avons essayé de déterminer *in vitro* le degré de pathogénicité de 6 isolats bactériennes à effet PGP, de régions de El Atteuf (Ghardaïa).

Nous avons réalisé une série des tests biologiques comporte une identification classique des souches étudiée (identifications macroscopiques, microscopiques et biochimiques), des tests enzymatiques telles que la recherches des enzymes lytiques, hémolytique, oxydase, catalase, protéase et coagulase en plus la formation de biofilm et des tests de l'antibiogramme qui permet d'étudier le profil de résistance et de sensibilité de ces souches aux antibiotiques.

La présence de trois souches Gram positives (S11, S32, TE23) et trois souches Gram négatives (CMBU, SE19, SE6). Selon la littérature, les souches qui sont positives dans au moins 4 tests parmi les tests réalisé dans la présente étude sont éventuels d'être une souche pathogène. Sur les 6 souches, aucune n'a plus de 4 tests positifs. Mais la souche TE23 a 3 tests positifs avec une résistance modérée aux antibiotiques. Cela peut qualifier la souche d'être modérément dangereuse pour une utilisation humaine directe en tant que biofertilisant.

Ces résultats nécessitent des confirmations par utilisation de autres techniques et méthodes d'études et s'analyse telle que les essayes *in vivo* et la discrimination moléculaire. Nos travaux ne présentent qu'une contribution au développement des méthodes simples et fiable afin de détecter et

Conclusion

estimer les risques potentiels des matériels biologiques telle que les bactéries à usage humaine dans les différents secteurs notamment dans les laboratoires de recherche. Ainsi, d'introduire ces tests de sécurité et d'évaluation des risques pour devenir des pratiques standard, garantissant la sécurité du personnel exposé et la gestion des effets secondaires dangereux

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références Bibliographiques :

1. ABHIJIT A et al. (2013). Study of urinary isolates with reference to extended spectrum beta lactamases detection and antibiogram. Vol 2, Issue 9, p1052
2. Al-Salih, G. (2013). Rôle des protéases de l'hôte dans l'endocardite infectieuse: recherche de marqueurs de l'activité biologique des végétations (Doctoral dissertation, Paris7).
3. Amina Boukhemis & Amina Boutersa ,(2015). Identification et antibiorésistance de souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* des infections urinaires à l'aide des moyens classiques et des moyens automatisés. Constantine.
4. Andersson, M. A., Mikkola, R., Helin, J., Andersson, M. C., & Salkinoja-Salonen, M. (1998). A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1338-1343.
5. Bharti, N., Vélchez, J, Keswani, C. Lally, R. D. Prakash, O. I., Sansinenea, E, ... & Singh, H. B. (2019). Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Science of the Total Environment*, 690, 841-852.
6. Carbonnelle, É. and X. Nassif (2011). "Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale." *médecine/sciences* 27(10): 882-888p.
7. Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*, 67(8), 3703-3713p.
8. Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95p.
9. Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA.edition en ligne.http: // www.ppidon-line.com.
10. Emmanuelle, B et El Amari. (2004). Traitement et pronostic des Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse n° 10406. Thèse présentée à la Faculté de Médecine De l'Université de Genève pour obtenir le grade de docteur en médecine.

Références bibliographiques

11. Fazli, M., Almblad, H., Rybtke, M.L., et al., 2014. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ. Microbiol.* 16, 1961–1981p.
12. FRENEY J, RENAUD P, LECLERCQ R et RIEGL P. (2007).
13. FRENEY J, RENAUD P, LECLERCQ R et RIEGL P. (2007). Précis de bactériologie clinique. 2 -ème Ed ESKA. P153 et 1012- 1013p.
14. Gagné-Thivierge, C. (2018). Étude de la virulence et de la formation de biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa*.
15. Gonçalves, A., F. Bertucci, et al. (2007). "Profiling protéique SELDI-TOF et cancer du sein- Applications cliniques potentielles." *médecine/sciences* 23: 23-26p.
16. Gonçalves, A., F. Bertucci, et al. (2007). "Profiling protéique SELDI-TOF et cancer du sein- Applications cliniques potentielles." *médecine/sciences* 23: 23-26p.
17. HAMDAN Z et al. (2011). Epidemiology of urinary tract infections and antibiotics sensitivity among pregnant women at Khartoum north hospital. Vol: 10.
18. Harkat, Y., Ziad, A., & Arabi, A. (2021). La Tolérance au cuivre chez des isorats rhizosphériques de *pseudomonas* fluorescents.
19. Hatt JK Rather PN Role of bacterial biofilms in urinary tract infections *Curr Top Microbiol Immunol* 2008 322 163 92.
20. Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev*;4:81-128.
21. Keswani, C., Prakash, O., Bharti, N., Vélchez, J. I., Sansinenea, E., Lally, R. D., ... & Singh, H. B. (2019). Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Science of the Total Environment*, p53.
22. Kheira, B. (2011). Isolement de souches de *Pseudomonas* à partir des sols et des nécroses d'oliviers de l'Ouest Algérien: Identification et caractérisation biochimique, sérotypique et phytopathologique. Recherche de l'antibiorésistance, d'antagonisme (bactériocine) et d'

Références bibliographiques

- ADN (Doctoral dissertation, université Mohamed Boudiaf des sciences et de la technologie d Oran).
23. Kırmusaoglu, S. (2019). The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. *Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods*, 1-17p.
 24. Koo, H., Falsetta, M. L., & Klein, M. I. (2013). The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *Journal of dental research*, 92(12), 1065-1073.
 25. Mandell, G.L et al. (2009). *Principales and practice of infectious diseases*. 6eme ed.
 26. Maresso, A. W. (2019). A short history of microbiologie. In *Bacterial Virulence* (pp. 2-6). Springer, Cham.
 27. Maresso, A. W. (2019). The form and function of bacteriel pathogene. In *Bacterial Virulence* (pp.16). Springer, Cham.
 28. Maresso, A. W. (2019). The Practice of the Microbe Hunter. In *Bacterial Virulence* (pp.23). Springer, Cham.
 29. Merniez, M., Merniez, S., & Merradi, L. (2018). Etude de la resistance aux antibiotiques des souches d'Escherichia coli Isolées du lait de vache commercialise dans la région d'Ain M'Lila et Ain Fakroun.
 30. Michalik, M., Samet, A., Podbielska-Kubera, A., Savini, V., Międzobrodzki, J., & Kosecka-Strojek, M. (2020). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) as a significant etiological factor of laryngological infections: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1-10.
 31. Murphy CN Clegg S Klebsiella pneumoniae and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation *Future Rev Microbiol* 2012 7 991 1002.
 32. Paul, S. (2005). *Bactériologie*. 6ed. Dunod. Paris. 515 p.
 33. PIERRE., MARIE CURIE. (2002-2003). *Bactériologie*. DCEM1. Université Paris-VI. Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière.

Références bibliographiques

34. Pina, P et al. (2000). Sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques en Unités de soins intensifs. *J Path Biol.* 48 : 485-489.
35. Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D., et Denis, F., (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Integrans : an antibiotic resistance gene capture system. Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* 20 : 343-352p.
36. Ploy, M.C., Lambert, T., Gassama, A., et Denis, F., (2000). Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *Annales de Biologie Clinique.* 58(4), 439-44p.
37. Prakash, O., Vílchez, J Bharti, N, Keswani, C. I., Sansinenea, E., Lally, R. D., ... & Singh, H. B. (2019). Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Science of the Total Environment*, 690p.
38. Précis de bactériologie clinique. 2 ème Ed ESKA. p153 et 1012 1013.
39. Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American society for microbiology, 1-6.
40. Ros, A. (1999). La résistance bactérienne ou le naufrage des antibiotiques. VIIIème assemblée annuelle des CLIN du sud-est. Lyon. 28 octobre.
41. SAIDANI MARYLINE. (2012-2013). Thèse en ligne : Epidémiologie des pyélonéphrites et prostatites communautaires : Les Traitements probabilistes recommandés sont-ils toujours adaptés ? Université Paris Diderot - Paris 7 faculté de médecine. France.25
42. Van Loon, L.C., Bakker, P.A., Pieterse, C.M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36 : 453– 483p.
43. Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406 : 775-81p.
44. Wani, A.H., Branion, R.M.R., Lau, A.K., 1997. Biofiltration: A promising and cost-effective control technology for odors, VOCs and air toxics. *J. Environ. Sci. Heal. . Part A Environ. Sci. Eng. Toxicol.* 32, 2027–2055p.

Références bibliographiques

45. Wei, Q., Ma, L.Z., 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. 14, 20983–21005p
46. Whipps, J. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J Exper Bot 52 : 487– 511p.
47. Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 417–423p.
48. Winkelströter, L.K., Teixeira, F.B. dos R., Silva, E.P., et al., 2014. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. Microb. Ecol. 68, 35–46p.
49. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/resistlacta/POLY.Chp.9.html>.
50. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/pathogene.html>
51. <https://bu.umc.edu.dz/theses/veterinaire/CHO4691.1>]]
52. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/resistlacta/POLY.Chp.9.html>.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Les réactifs.

1. Préparation du réactif d'oxydase

Dans un petit tube à hémolyse de 5 ml, dissoudre un point de couteau de N, N, N', N'tétraéthyle 1-4 phénylène diamine dans 5 ml d'eau distillée.

Boucher puis agiter.

Recouvrir le tube de papier aluminium, il est très sensible à la lumière.

Le réactif conservé au réfrigérateur à l'abri de la lumière, il est stable 6 h.

Réactifs des API

Réactif VP1

Ethanol 10ml et α -Naphtylamine 0.5g

Réactif VP2

N, N-diméthyl-1-naphtylamine 0.6g Acide acétique 30g.

H₂O 70ml

Annexes

Annexe 2. Les résultats

Tableau1. Résultats de API20E

Se19

Galerie	API 20 E V4.1
Profil	2 2 0 6 6 7 7
Note(s)	POSSIBILITE DE Enterobacter cloacae
	POSSIBILITE DE Erwinia spp

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Serratia ficaria			ONPG 99%	ADH 0%	MAN100%	OX 0%
Citrobacter freundii			ONPG 90%	ADH 24%	H2S 75%	GEL 0%
			MAN 99%	INO 25%	OX 0%	
Pantoea spp 2			ONPG 99%	ADH 1%	GEL 4%	MAN 99%
			OX 0%			

SE6

PROFIL INACCEPTABLE

Galerie	API 20 E V4.1
Profil	7 3 6 1 1 7 3
Note(s)	POSSIBILITE DE Enterobacter cloacae

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Enterobacter sakazakii			LDC 0%	TDA 0%	IND 25%	GLU 100%
			INO 75%			

Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Enterobacter cloacae			LDC 1%	TDA 0%	IND 0%	GLU 99%
			SOR 90%			

Annexes

CMBU

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Burkholderia cepacia			CIT 78%	VP 1%	AMY 7%	ARA 20%
			OX 90%			
Pseudomonas oryzae			CIT 89%	VP 25%	GEL 1%	AMY 0%
Pseudomonas luteola			ONPG86%	ADH 75%	CIT 94%	VP 25%
			GEL 13%	GLU 84%	AMY 1%	
Non-fermenter spp			VP 15%	GEL 9%	AMY 1%	ARA 1%
			OX 93%			
Pseudomonas fluorescens/putida			ADH 75%	CIT 75%	VP 10%	AMY 1%

Annexe 3. A P I 2 0 E :

Présentation des galeries API 20 E (d'après la documentation Bio Mérieux).

1. Principe

La galerie API 20 E, commercialisée par la société « bioMérieux,» est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation. La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H₂S), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides" : glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA). La galerie permet également la recherche du nitrate réductase qui se fait dans le microtube "GLU".

2. Technique

- Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée.
- Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium".
- A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.

Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule. Lorsque le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H₂S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.

Annexes

Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube. Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

3. Lecture et interprétation :

Lecture de la galerie :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.

Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.

Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **négative**.

Interprétation :

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 Ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 Lorsqu'elle est positive.

Annexes

M

- ❖ The wells are marked off into triplets by black triangles.
- ❖ For each triplet if the first test is positive, the well will take **1**, if the test is negative it will take 0.
- ❖ For each triplet if the second test is positive, the well will take **2**, if the test is negative it will take 0
- ❖ For each triplet if the third test is positive, the well will take **4**, if the test is negative it will take 0
- ❖ Add up the scores for the positive wells only in each triplet. The highest score possible for a triplet is 7.

Oxidase may also be included in the profile.

Enter the numerical profile in the apiweb to obtain the identity.

Annexes

Tableau de résultats

Tests	Composants actifs	Qte	Réactions	Résultats	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βDGalactopyranosidase	Incolore	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune	rouge
<u>LDC</u>	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0,756	Utilisation du CITrate	vert pâle - jaune	bleu-vert - bleu
<u>H2S</u>	sodium thiosulfate	0,075	Production d'H2S	incolore - grisâtre	dépôt noir - fin liseré
URE	Urée	0,76	UREase	Jaune	rouge - orangé
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	TDA-immédiat	
				Jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole /	JAMES-immédiat	
				Incolore-vert pâle-jaune	rose
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				incolore - rose pâle	rose - rouge
<u>GEL</u>	Gélatine	0,6	Gélatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation - oxydation	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	(GLUcose	bleu - bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	1,9	fermentation - oxydation (MANnitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation - oxydation (INOsitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation - oxydation (SORbitol)	bleu - bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation - oxydation (RHAmnose)	bleu - bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation - oxydation (SACcharose)	bleu - bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation - oxydation (MELibiose)	bleu - bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose /	1,9	fermentation - oxydation (SACcharose)	bleu - bleu-vert	jaune
AMY	Amygdaline /	0,57	fermentation - oxydation (MELibiose)	bleu - bleu-vert	jaune