

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Ghardaïa



N° d'ordre :

N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de vie et de science de la terre

Département de biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En sciences biologique

Spécialités : Biochimie appliquée

Par : M^{elle}. MOULAY OMAR HAFSA

M^{elle}. MESSAI FOUZIA

Thème :

Contribution à la détermination in vitro le degré de virulence de six souches bactériennes isolées à partir d'un sol nu de la vallée du M'zab

Soutenu publiquement le : 05/09/2022

Devant le jury composé de :

M ^{me} . KADRI M.	MCB	Univ. Ghardaïa	Présidente
M. BAKELLI A.	MAA	Univ. Ghardaïa	Encadrant
M ^{me} . KHELOUFI M.	Doctorant	Univ. Ghardaïa	Co-Encadrant
M ^{me} . DJEMOUAI N.	MAA	Univ. Ghardaïa	Examinatrice

Année universitaire : 2021 - 2022

Remerciements

Je remercie **ALLAH** le tout puissant pour avoir donné le courage, la force et la persistance de m'avoir permis de finaliser ce travail dans les meilleurs conditions **HAMDOULIALAH**.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude au directeur de ce mémoire le professeur **BAKELLI AISSA**, pour sa patience, sa disponibilité, et ses conseils tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier spécialement Monsieur **MOULAY OMAR ALI**, pour ces conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

A Monsieur **BENHAMOUDA HICHAM** je trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour l'honneur d'avoir consacré de son précieux temps pour me guider dans le laboratoire.

A Monsieur **BELHAJ AISSA LAKHDAR**, pour m'avoir accueillie au sein de laboratoire de l'hôpital à **METLILI**.

Un grand merci à mon adorable amie **KADI MOUNA**, qui m'a été d'un réel soutien tout au long de ma carrière.

Je ne saurai oublier d'exprimer ma reconnaissance à mon amie **YAEKOUB KHADIDJA**, pour ces précieux conseils.

Un grand merci pour Monsieur **YACINE**, pour m'avoir accueillie au sein de laboratoire **EL SALAM** pour continuer mon travail.

Je tien de remercier la doctorante **MAROUA KHELOUFI**, pour ses conseils pendant la rédaction de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

♥ *Mon adorable maman KHADIDJA* ♥

Elle m'a soutenu dans mon travail avec ses précieux conseils

Ma mère est la source de tendresse.

♥ *Mon papa MAHMOUD* ♥

Qui est fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices

Pour m'aider à avancer dans la vie.

♥ *Ma chère grand-mère MASSOUDA* ♥

Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé.

♥ *Mon grand-père MOHAMED* ♥

Cher à nos cœurs, que Dieu vous protège pour nous.

♥ *Mes très chères tantes* ♥

FOUZIA RACHIDA NAZIHA

♥ *Mes chers oncles* ♥

MOSTAFA MOKHTAR NACER KHALIL HACHEMI

DINE et CHOAIB

♥ *Mes très chères sœurs* ♥

SAFA KAOUTAR ANISSA

♥ Mes très chers frères ♥

MOHAMED HABIBE et AMINE

♥ A toute la famille MOULAY OMAR et la famille BEN AMAR ♥

♥ Mes très chères amies ♥

MOUNA KHADIDJA BAKHTA

♥ A toute la famille MESSAI ♥

Spécialement mon amie MESSAI FOUZIA qui à contribuer à ce travail.

HAFSA

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATB : Antibiotique

AMC : Amoxicilline+ acide Clavulanique

ATM : Aztréonam

AM : Ampicilline

CIP : Ciprofloxacine

CN : Gentamicine

CTX : Céfotaxime

DA : Clindamycine

E : Erythromycine

IMP : Imipinèm

KF : Céphalotine

LBSM : Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens

LE : Lévofloxacine

LPS : Lipopolysaccharides

MEC : Matrice extracellulaire

MSCRAMM : Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules

P : Benzylpénicilline

SFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

SXT : Sulfaméthoxazole + Triméthoprime

TE : Tétracycline

TC : Ticarcilline

VA : Vancomycine

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Taxonomie de genre <i>Pseudomonas</i> selon (Benabid, 2009)	3
Tableau 2	Les principales toxines bactériennes selon (Ait Zine, 2019)	7
Tableau 3	Echelle de sensibilité des germes (Djabou <i>et al.</i> , 2013)	18
Tableau 4	Principales caractéristiques des colonies	20
Tableau 5	Les bactéries étudiées	24

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Aspect microscopique de la souche S30	21
Figure 2	Aspect microscopique de la souche S22	21
Figure 3	Aspect microscopique de la souche S43	22
Figure 4	Aspect microscopique de la souche SE20	22
Figure 5	Aspect microscopique de la souche TE8	23
Figure 6	Aspect microscopique de la souche X15	23
Figure 7	Activité coagulante des souches étudiées	25
Figure 8	Activité hémolytique des souches étudiées	26
Figure 9	Activité protéolytique des souches étudiées	27
Figure 10	La formation de biofilm des souches étudiées	27
Figure 11	Diamètre d'inhibition de la souche X15	28
Figure 12	Diamètre d'inhibition de la souche S43	29
Figure 13	Diamètre d'inhibition de la souche SE20	30
Figure 14	Diamètre d'inhibition de la souche TE8	30
Figure 15	Diamètre d'inhibition de la souche S30	31
Figure 16	Diamètre d'inhibition de la souche S22	31

Résumé

Notre étude a été menée pour identifier et déterminer les caractéristiques de virulence de six types de bactéries à effet PGPR isolés à partir de sols nus de la vallée de M'zab. Les caractéristiques de virulence ont été déterminées par analyse enzymatique, test de sensibilité aux antibiotiques, et formation de biofilm. Les résultats montrent que ces bactéries appartenant aux espèces suivantes *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus cereus*, *Sporosarcina pasteurii*, et *Brevibacillus brevis* via les systèmes d'API. L'espèce *Pseudomonas fluorescens* produit un biofilm important qui est considéré comme un facteur de virulence. Les deux espèces *Brevibacillus brevis*, et *Sporosarcina pasteurii* ont une activité hémolytique et protéolytique très importante sur gélose au sang et gélose au lait écrémé respectivement. Toutes ces souches sont considérées comme des souches potentiellement virulentes, tandis que, la souche *Bacillus cereus* est non virulente.

Mots clés : Six Souches bactériennes, sols nus, vallée de M'zab, virulence.

Abstract

A study was conducted to identify and determine the virulence characteristics of six types of PGPR bacteria isolated from bare soils of the M'zab Valley. The virulence characteristics were determined by enzymatic analysis, antibiotic susceptibility test, and biofilm formation. The results show that these bacteria belonging to the following species *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus cereus*, *Sporosarcina pasteurii*, and *Brevibacillus brevis* via API systems. The *Pseudomonas fluorescens* species produces a significant biofilm that is considered a virulence factor. The two species *Brevibacillus brevis*, and *Sporosarcina pasteurii* have a very important hemolytic and proteolytic activity on blood agar and skim milk agar respectively. All these strains are considered as potentially virulent strains, whereas, the *Bacillus cereus* strain is non-virulent.

Key words: six Bacterial strains, bare soil, M'zab valley, virulence.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	I
Dédicace	II
Listes des abréviations	III
Listes des tableaux	IV
Listes des figures	V
Résumé	VI
Abstract	VII
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Généralité	
1. Généralité sur les bactéries	3
1.1. Le genre Pseudomonas	3
1.2. Le genre Aeromonas	4
1.3. Le genre Bacillus	4
2. La virulence	4
2.1. Les facteurs de virulence	5
2.1.1. Les adhésines	5
2.1.2. Les toxines	6
3. Stratégies de la virulence basée sur l'altération génomique	7
3.1. L'aquisition et la perte de génome	7
3.2. Variation de phase	7
3.3. Duplication et redondance	8
4. Régulation de la virulence	8

4.1. Système à deux composants	8
4.2. Régulateurs et régulons centraux	9
5. La mesure de la virulence	9
Chapitre II : Les marqueurs de virulence	
1. Méthodes classiques pour la recherche de virulence in vitro	10
1.1. Tests enzymatiques	10
1.2. Formation de biofilm	10
1.3. La résistance aux antibiotiques	11
Matériel et méthodes	
1. Matériel et méthode	13
1.1. Matériel	13
1. 1.1. Matériel biologique	13
1.1.2. Appareillages	13
1. 1.3. Produits et réactifs	14
1. 2. Méthode	14
1. 2.1. Enquête	14
1. 2.2. Ensemencement	14
1. 2.3. Techniques utilisés pour l'identification des bactéries	14
1.2.4. Tests de virulence	17
1.2.5. La capacité à former le biofilm	17
1.2.6. Tests de résistance aux antibiotiques	18
Résultats et discussion	
1. Origine et identification des souches	20
1.1. Observation macroscopique	20

1.2. Observation microscopique	20
1.3. Systèmes API	24
2. Les marqueurs de virulence	25
2.1. Activités enzymatiques	25
2.1.1. Activité coagulante	25
2.1.2. Activité hémolytique	25
2.1.3. Activité protéolytique	26
2.2. La formation de biofilm	27
2.3. La résistance aux antibiotiques	28
Conclusion	33
Références bibliographiques	35
Annexes	I

Introduction

Introduction

Le sol constitue une mosaïque d'habitats avec pour chacune des populations bactériennes propres (MARILLEY *et al.*, 2007). Les bactéries sont très abondantes dans les sols, ce sont des organismes procaryotes de très petites tailles, parmi les bactéries les plus abondants il ya les *Pseudomonas*, les *Bacillus* sporulés. Sont relativement bien représentés les genres : *Clostridium*, *Achromobacter*, *Xanthomonas*, *Sarcina* (Dommergues et Mangenot, 1970). Certains espèces ont un effet important dans l'environnement telle que les *Pseudomonas* qui sont capable de dégrader de nombreux composés organiques et participer dans le processus de décontamination de sols. Ils ont une activité PGPR en mobilisant certains nutriments nécessaires à la croissance de la plante (Meliani, 2012).

Cependant, ces bactérie peuvent etres à l'origine de plusieurs maladies et infections. Le concepte de la virulence est une propriété microbienne intrinsèque qui distingue les organismes pathogènes de non pathogènes. Elle sont fondée sur des descriptions des caractéristiques microbiennes, notamment son degré de pathogénicité et sa capacité à croitre at à se multiplier dans un hote.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à étudier le degré de virulence de six souches bactériennes a effet PGPR selon (BAKELLI, 2020), isolées à partir du sols nus.

Le présent manuscrit est présenté en deux parties. La première partie enferme deux chapitres, le premier trait des généralités sur le genre *pseudomonas*, *aeromonas*, *bacillus* et leurs caractères généraux, le second chapitre présente des notions sur la virulence et la pathogénicité des bacteries.

La deuxième partie est consacrée aux différents méthodes pour détermine le degré de virulence de six souches bactériennes. Pour cela, notre travail vise à atteindre les objectifs suivants :

- Ensemencement sur le milieu ordinaire gélose nutritive.
- Identification classique des souches étudiées (observation macroscopique et microscopique).
- Identification biochimique (les tests de catalase et oxydase, et les systèmes d'API).
- Détermination de la virulence par des analyses enzymatique, formation de biofilm, et la résistance aux antibiotiques.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité

1. Généralités sur les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires, ubiquistes, de petites tailles (Dykhuizen, 2005). Ce sont des organismes procaryotes qui possèdent un ADN chromosomique situé dans le cytoplasme. D'autres bactéries contiennent un ADN extra-chromosomique, appelée plasmide. Ils présentent une grande diversité de formes, les cellules peuvent être sphériques (cocci), allongées (bacilles), ou forme spiralées (Paolozzi, 2015).

1.1. Le genre de *Pseudomonas*

Les bactéries de genre *Pseudomonas* sont ubiquitaires, comprend des bacilles fins, rectilignes, ou plus rarement incurvés. Elles sont saprophytes et jouent un rôle important dans les sciences de la santé, l'agriculture, la microbiologie, la biotechnologie et la science de l'environnement (Palleroni, 1992 ; Lakhdari *et al.*, 2021).

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Ce sont des bacilles à Gram négative, mobile grâce à une ciliature polaire. Elle se cultive bien sur des milieu ordinaires (Pilet *et al.*, 1979).

Les *Pseudomonas* sont classé selon la hiérarchie suivante : (Benabid, 2009).

Tableau 1 : Taxonomie de genre *Pseudomonas* selon (Benabid, 2009)

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>

1.2. Le genre *Aeromonas*

Les bactéries de ce genre sont des bacilles Gram négatif, mobile grâce à une ciliature de type lophotriche. Elles sont fréquemment isolées à partir des eaux, du sol, et divers produits (Soussy *et al.*, (1975). Elles appartiennent à la famille des Aeromonadaceae au sein des Gammaproteobactéries, se divise en deux groupes. Le premier est représenté par *aeromonas salmonicida* qui provoque des infections chez les poissons, et l'autre groupe d'intérêt médicale regroupe des espèces responsables à des infections chez l'homme (Floug , 2020).

1.3. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* comprend des bactéries ubiquistes, hôte normale de sol peuvent produire des endospores. Ce sont des bactéries Gram positive, forme de bâtonnets, mobile grâce à des ciliatures péritriches (Bouchard-Rochette, 2020). Parmi les utilisations des *Bacillus* on trouve, la production des antibiotiques, la fixation d'azote atmosphérique, et la solubilisation de phosphore.

Certaines espèces de genre *Bacillus* peuvent causer des toxi-infections alimentaires chez l'homme, ou d'infection opportuniste dont l'origine est *Bacillus Cereus* (Khelif et Chegrouche , 2020).

2. La virulence

Le mot virulence dérive de mot latin « virus » qui signifie tout agent pathogène qui provoque une maladie (Poulin et Combes , 1999).

La reconnaissance que la virulence est une caractéristique à multiples facettes de certains microbes mais pas d'autres a donné lieu à des efforts pour définir ses attributs. Les premières définitions de la virulence étaient fondées sur des descriptions des caractéristiques microbiennes, notamment son degré de pathogénicité, sa capacité à surmonter les défenses de l'hôte, la gravité de la maladie qu'il provoque ; et sa capacité à se développer et à se multiplier dans un hôte (Casadevall et Pirofski , 1999). La virulence provient de deux facteurs microbiens, la toxicité et l'agressivité qui est défini comme la variation quantitative de pouvoir pathogène (Lê Van , 2011).

2.1. Facteur de virulence

Un facteur de virulence est tout produit bactérien, généralement une protéine, nécessaire aux microorganismes pour provoquer une maladie (**Anthony William Maresso, 2019**).

Les bactéries pathogènes présentent un vaste arsenal de facteurs de virulence qui leurs permettent d'envahir et de coloniser les tissus des organismes hôtes. Un certain nombre de ces facteurs sont présentés à la surface des cellules et comprennent des adhésines qui participent à l'adhésion aux cellules hôtes, des toxines qui peuvent être secrétées et endommager les tissus de l'hôte.

2.1.1. Les adhésines

L'attachement des bactéries à d'autres surfaces nécessite la production des adhésines qui définies comme facteurs de virulence nécessaires à l'expression de la nocivité bactérienne (**Isenberg, 1988**).

➤ **Fimbriaes, pili de type 5, et flagelles**

a. Les pili de type

Les pili de type sont des structures indispensables dans l'adhérence et l'invasion de plusieurs divers microorganismes (**Russel et Herwald , 2005**). Ils ont un diamètre de 5-7nm et peuvent s'étendre plusieurs micromètres de long. Les pili de type s'attachent à divers surfaces, y compris les surfaces non biologiques, à d'autres bactéries, ainsi qu'à des cellules eucaryotes. Dans le cas de pili de type, L'extrémité de pilus se lie à des récepteurs spécifiques sur les cellules épithéliales. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le pilus de type est la principale adhésine responsable de l'attachement aux cellules épithéliales (**Khalifa et al., (2011)**). Il est également impliqué dans les mobilités de type « twitching » et de type « swarming ».

b. Les fimbriaes

Les fimbriae sont des appendices protéiques présents chez de nombreuses bactéries qui sont plus fins et courts. Ils fonctionnent comme des organelles spécifiques qui facilitent la colonisation bactériennes des surfaces muqueuses. Ils agissent comme de facteurs d'invasion et de motilité. Trois systèmes Cup appelés cup A , cup B et cup C ont été identifiés chez *Pseudomonas aeruginosa* (**Khalifa et al., (2011)**). ces facteurs jouent un rôle dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et la formation de biofilm.

c. les flagelles

Les flagelles interviennent dans la pathogénie des bactéries non seulement en tant qu'organelles assurant la mobilité et la dissémination de la bactérie, mais également en tant qu'adhésines favorisant l'invasion et la colonisation de l'hôte par la bactérie (Feldman et al. 1998).

➤ MSCRAMMs

Les MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules) sont des protéines d'adhésion, assurant la médiation de la fixation initiale des bactéries au tissu hôte. Ils se lient à des composants de la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte. Cela comprend la fibronectine, collagènes, laminin, élastine, fibrinogènes et autres (Received for publication, July 30, 2007, and in revised).

Les MSCRAMMs ont une forme conservée constituée principalement d'une séquence signal N-terminale joue un rôle dans la sécrétion, un domaine de liaison au ligand, une ou plusieurs séries de répétitions polypeptidiques, et une région C-terminale impliquée dans l'ancrage de la paroi cellulaire. Chez *Acranobacterium Pyogenes*, le CbpA est le médiateur d'adhésion au collagène de type I, II, III et IV de l'hôte (Esmay et al., 2003).

2.1.2. Les toxines

Les toxines sont des substances macromoléculaires et antigéniques d'origine bactérienne, toxique pour d'autres organismes vivants. Généralement synthétisée au cours de la phase exponentielle de croissance. Les toxines bactériennes sont divisées en deux groupes endotoxines et exotoxines.

✓ Exotoxines

Les toxines bactériennes parmi les mécanismes élaborées par les bactéries pathogènes pour provoquer des maladies. Les exotoxines sont des protéines produites à l'intérieur de la bactérie puis libérées dans le milieu extracellulaire (durant la phase de croissance de bactérie), (A Lezzar, 2016). Ils ont un pouvoir toxique et antigénique très élevé (AIT ZINE, 2019).

✓ Endotoxines

les endotoxines ont été déterminées comme des substances thermostables, correspondent au lipide A de lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram négatifs libérés après la lyse bactérienne. Ils ont un pouvoir toxique et antigénique faible (AIT ZINE, 2019), les

endotoxines peuvent causer des symptômes variés allant d'une fièvre accompagnée de frissons jusqu'au choc toxique (endotoxines en milieu de travail).

Tableau2 : les principaux toxines bactériennes selon (AIT ZINE, 2019).

La bactérie	La toxine	Effet
<i>Clostridium tetani</i>	Tétanique	Neurotoxine responsable de tétanos
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulique	Cause le botulisme
<i>Staphylococcus aureus</i>	superantigéniques	Choc toxique stapylococcique et toxi-infections alimentaires
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholérique	Responsable de diarrhée intensive

✓ **Le polysaccharide capsulaire**

C'est un facteur de virulence important, il se trouve sur la surface externe d'un grand nombre de bactéries. Les molécules de polysaccharide capsulaire sont hautement hydratées et constituent plus de 95% d'eau . La capsule est le médiateur des interactions entre la bactérie et son environnement immédiat. Donc, elle présente un certain nombre de fonctions telles que la résistance à la dessiccation, adhérence, résistance à l'immunité non spécifique de l'hôte, et résistance à l'immunité spécifique de l'hôte (**Russell et Herwald , 2005**).

3. Stratégie de la virulence basée sur l'altération génomique

3.1. L'acquisition et la perte de gène

Les moyennes de la mutation les plus importants qui changent l'évolution de la virulence sont le changement de novo, transformation, conjugaison, et transduction. Ces derniers peuvent mener à l'acquisition ou la perte d'un gène. Plusieurs bactéries avirulentes transformées en plus virulentes à cause de l'acquisition d'une toxine. Tandis que, la diminution de la virulence est exprimée par la perte d'un ou plusieurs gènes.

3.2. La variation de phase

La variation de phase c'est un mécanisme de régulation chez les bactéries, utilisée pour activer ou désactiver les gènes (phase on or off). Elle est très important pour réguler certains facteurs de virulence tell que, les pilis, les fimbrea, les flagelles pour le mouvement des

bactéries, la capsule, et la production de lipopolysaccharides. Ce dernier pour s'échapper de système immunitaire. Il existe de types différents de changement de phase, le premier entraîne un changement de code de l'ADN (modification génomique), et l'autre modification épigénomique (Van Der Woude et Bäumlér, 2004).

3.3. Duplication et redondance

La virulence peut être altérée par d'autre modification de génome notamment la redondance, qui signifie deux copies d'un même gène (Ghosh et O'Connor, 2017). La duplication a deux objectifs principaux, le premier consiste à permettre une répllication rapide de bactérie pathogène dans un hôte. Et le deuxième, si un gène bactérienne est endommagée cette stratégie permet à la bactérie de garantir la présence des propriétés de telle gène (Anthony W M).

4. Régulation de la virulence

Les bactéries possèdent des systèmes de détection situés dans leurs membranes de surface. Les protéines de membrane reçoivent le signal et le transmettent à des protéines à l'intérieur de la cellule, ces signaux peuvent être la température, le pH, l'osmolarité, et le stress membranaire. Ces derniers sont détectés par les bactéries pathogènes donc elle doit se préparer pour adapter à ces changements.

4.1. Système à deux composants

Le système à deux composants c'est un système constitué de deux composants liés l'un à l'autre. Chacun comporte une fonction importante mais distincte, le premier c'est une kinase de capture qui transfère des signaux via un groupe phosphate à une protéine réceptrice. Le deuxième c'est un régulateur de réponse, qui reçoit le groupe phosphate de domaine récepteur sous la forme de phosphorylation d'acide aspartique. Ces changements au niveau de régulateurs vont empêcher ou activer la transcription qui va par la suite influencer le potentiel de virulence des bactéries. Chez *Streptococcus Suis* qui est un pathogène zoonotique provoque des infections et grandes pertes économiques, avait au moins 15 groupes de système de régulation bicomposants qui lui permettent de détecter les signaux environnementaux et améliorer sa virulence (Zheng *et al.*, (2018)).

4.2. Régulateurs centraux et régulons

Les changements de l'environnement de l'hôte ont des effets négatifs sur les bactéries en croissance, pour cela ces derniers possèdent d'autres mécanismes pour augmenter la virulence est d'intégrer des régulateurs. Elles peuvent être des protéines cytosoliques, des amplificateurs ou des répresseurs de transcription. D'une manière générale la régulation se fait en se liant au promoteur de régulons, activant ou réprimant la transcription de gène.

5. La mesure de la virulence

La mesure de la virulence dans un modèle animale c'est une méthode basée sur l'observation de l'inoculum nécessaire pour tuer un animale sensible. A la suite des travaux, la virulence est définie comme inversement proportionnelle aux nombres des micro-organismes nécessaires pour causer une infection (**Casadevall et Pirofski, 2001**). Donc la virulence a été déterminée en déterminant une dose létale de 50%. Elle dépend de plusieurs facteurs comme une étude de (**Wong *et al.*,1996**). En vue de déterminer la virulence des souches d'*Aeromonas* par l'utilisation des souris allaitantes, ils ont rapporté que la virulence était multifactorielle.

Chapitre II : Les marqueurs de virulence

1. Les méthodes classiques de la recherche de la virulence

La recherche de la virulence in vitro est basée sur des tests classiques comportent des tests enzymatiques, la formation de biofilm, et la résistance aux antibiotiques.

1.1. Tests enzymatiques

a. Test de Coagulase

Le test coagulase est une méthode fiable pour distinguer les souches pathogènes de non pathogènes (**Todd et al., 1953**). Duthie en 1954 a purifié le facteur de coagulation, la protéine liée aux cellules qui est appelée le coagulase liée. Cette protéine agit sur le fibrinogène pour provoquer la coagulation. (**O Connell et al., 1998**) ont identifié le coagulase liée comme un adhésive des composants de surface microbienne reconnaissent les molécules de matrice adhésive. **Panizzi et al., 2004** indiquent que le fibrinogène est une enzyme qui agit comme la thrombine clivée en fibrine par l'action de staphylo-coagulase prothrombine. C'est la fibrine qui forme le caillot visible.

Principe

Staphylococcus aureus produit deux types de coagulase, celle à l'état libre et à l'état lié. Le coagulase à l'état libre est une enzyme extracellulaire produite lorsque l'organisme est cultivé dans un bouillon. Alors que le coagulase lié est appelé facteur d'agglutination, reste attaché à la paroi cellulaire de l'organisme.

1.2. La Formation de biofilm

Les bactéries ont été considérées comme vivant préférentiellement dans un état planctonique. Cependant la majorité d'entre elles peuvent se trouver dans un biofilm (état sessile). Ce dernier est défini comme une population bactérienne adhérente à une surface et incorporée dans une matrice d'exopolysaccharide (**MAHAMAT et al., 2013**). Les biofilms posent de nombreux problèmes notamment dans le milieu hospitalier, elles contribuent aux infections nosocomiales, ont la capacité de se développer sur des cathéters, et dans les tubes de ventilation artificielle. Le biofilm occurent aux bactéries une résistance élevée aux agents antimicrobiennes telles que les antibiotiques (**Roux et al., 2006**). Il joue un rôle dans la

persistance des bactéries dans un environnement donné par des mécanismes de régulation, cela va augmenter sa virulence.

1.3. La Résistance aux antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques a systématiquement induit l'émergence et la sélection de bactéries résistantes à l'action de ces molécules. Ces bactéries ont été découvertes en premier temps dans un milieu hospitalier, puis dans la population, chez les animaux d'élevages et dans l'environnement.

a. Antibiotique

L'antibiotique est une substance naturelle ou synthétique capable d'empêcher la multiplication de certaines bactéries ou de les détruire de mode d'action spécifique, actif à des concentrations faibles (de l'ordre du g par mL ou mg/L). Les antibiotiques utilisés en pathologie humaine sont en général peu toxiques pour les cellules eucaryotes supérieures. Certains antibiotiques antibactériens comme les sulfamides sont aussi actifs contre certains parasites eucaryotes (toxoplasme, Plasmodium du paludisme,...). La classification des antibiotiques n'est pas aisée mais est principalement basée sur leur nature biochimique (**Boutal, 2017**).

b. La Résistance

La résistance aux antibiotiques a, en effet pour corollaire l'échec thérapeutique. Est due à l'utilisation quotidienne de ces agents dans tous les domaines. La résistance bactérienne est due soit à une mutation au niveau de l'ADN chromosomique, ou à la suite de l'infection d'un plasmide provenant d'une autre bactérie (**Leclerc et al., 1983**).

Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

Souches bactériennes

Dans notre travail nous avons étudié six souches bactériennes isolées à partir de sols nus. S30, S22, S43, SE20, TE8 et X15 collectés de la vallée du M'zab dans la commune d'EL-atteuf wilaya de Ghardaia. L'isolement se fait par monsieur BAKELLI Aissa (2020) dans le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de L'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

1.1.2. Appareillage

Nous avons utilisé dans le cadre de nos investigations l'appareillage suivant :

- Bec benzen ;
- Agitateur magnétique chauffant (**STUART**) ;
- Agitateur vortex (**DRAGON MX- S**) ;
- Balance de précision (**OHAUS**) ;
- Microscope optique (**μ SMART**) ;
- Centrifugeuse (**SIGMA**) ;
- Incubateur (**MEMMERT**) ;
- Etuve (**NUVE EN 400**) ;
- Autoclave (**HIRAYAMA**).

1.1.3. Produits et réactifs

Les produits et réactifs utilisés dans cette étude sont les suivants :

- Colorants et réactifs spécifiques (violet de Gentiane, fuschine, lugol, réactif oxydase, VP1 et VP2) ;
- Milieux de culture et autres (gélose nutritive, Muller Hinton, gélose au lait écrémé, gélose Columbia au sang frais, LB, eau physiologique et eau oxygénée (H₂O₂)).
- Les antibiotiques

β lactamines : Amoxicilline+ acide Clavulanique (AMC) (30μg), Céfotaxime (CTX) (30μg), Imipinèm (IPM) (10μg), Benzylpénicilline (P) (10μg), Aztréonam (ATM) (30μg), vancomycine (VA) (30μg), Ticarcilline (TC) (75 μg), Céphalotine (KF) (30μg), Ampicilline (AM) (10μg). Quinolones : Ciprofloxacine (CIP) (5μg), Lévofloxacine (LE) (5μg). Macrolides : Erythromycine(E) (15μg), Clindamycine (DA) (2μg). Sulfamides : Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (SXT) (25μg). Aminosides : Gentamicine (CN) (10μg). Tétracycline (TE) (30μg).

1.2. Méthodes

1.2.1. Enquête

Une enquête est réalisée sur six souches bactériennes (biofertilisants) destinés pour l'agriculture. L'objectif de cette enquête vise à déterminer le degré de virulence. Cette étude à été réalisée au laboratoire de bactériologie de l'université de Ghardaïa, en collaboration avec laboratoire **El- Salam à Sidi Abaz**.

1.2.2. Ensemencement

L'ensemencement est réalisé en stries séries puis large avec coton-tige stérile sur toute la boîte de gélose nutritive, puis incubées à 30°C pendant 72h.

1.2.3. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

L'identification des souches a porté sur une série de tests préliminaire (examen macroscopique, examen microscopique), et tests biochimiques.

1.2.3.1. Tests préliminaire

a. Observation macroscopique

L'aspect des colonies sur le milieu solide (gélose nutritive) permet une orientation sur les colonies, leur forme, leur couleur, leur taille...

b. Observation microscopique

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram est la base de la bactériologie. Elle permet de différencier entre les bactéries, d'après leur forme et leur affinité pour les colorants.

Principe

Le premier colorant, le cristal violet va colorer en violet les bactéries, puis le lugol libère de l'iode qui va fixer le colorant précédent. Un complexe iodo-cristal violet se forme ; il sera solubilisé par l'alcool à 70°C lors de la phase de décoloration, uniquement pour les bactéries à Gram négatif. Le deuxième colorant, la safranine va colorer en rose les bactéries à Gram négatif ; les bactéries Gram positive, non décolorés par l'alcool, ont conservé leur couleur violette. Les étapes de coloration (annexe) selon (**RymaL A B I O D, 2016**).

c. Test catalase

Le catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène, selon la réaction suivant :



Technique

Une goutte d'eau oxygénée (solution fraîche) est placée sur une lame propre et une quantité de la culture est prélevée avec la boucle et placée sur la goutte d'eau oxygénée, un résultat positif se traduit par un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles (**Belkadi et al., 2016**).

d. Test oxydase

Un papier absorbant imprégné de N, N, N, N-Tétraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride est placée sur une lame à l'aide d'une pince, puis une colonie est prélevé à l'aide d'une anse à platine y est réparti sur le disque. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une couleur violette (Belkadi *et al.*, 2016).

e. Galerie api 20^E

D'après le test d'orientation les souches S30, S43 et S22 doit êtres identifier via Api CHB, mais selon les disponibilités on utilise le système Api 20^e. Api 20^e est un system standardisé comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, comporte 20 micro- tubes contenant des substrats déshydratés (Ryma L A B I O D, 2016).

➤ **Préparation de l'inoculum**

Une colonie isolée à partir de milieu gélose nutritive (culture de 24 heures) est prélevée a l'aide d'une anse stérile, et la suspendue dans 5ml d'eau physiologie dont la turbidité équivalente à 0.5 McFarland. Puis la suspension bactérienne est homogénéisée à l'aide d'un vortex.

➤ **Inoculation de la galerie**

Les tubes des tests ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY et ARA sont remplis avec la suspension bactérienne on utilisant une seringue stérile. La seringue est déposé sur le coté de la cupule pendant le remplissage pour éviter la formation de bulles au fond de tubes. Pour les tests encadrés CIT, VP et GEL les tubes et les cupules sont remplis. Les cupules des cinq tests soulignés (ADH, LDC, ODC, H₂S et URE) sont remplis avec l'huile de paraffine pour crée l'anaérobiose. La galerie est additionnée de l'eau distillée stérile et incubé pendant 24 heures à 37°C.

f. Galerie api 20 non E

Les deux souches TE8 et X15 sont identifiés via Api 20ne. Api 20ne est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négative non entérobactéries et non fastidieux, comporte 20 micro –tubes contenant des substrats déshydratés (Ryma, 2016).

➤ **Inoculation de la galerie**

Les tubes de tests NO₃ à PNPG sont remplis avec la suspension bactérienne on utilisant une seringue stérile. La seringue est déposé sur le coté de la cupule pendant le remplissage pour éviter la formation de bulles au fond de tubes. Pour les tests encadrés GLU à PAC les tubes et les cupules sont remplis. Les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH et URE) sont remplies avec l'huile de paraffine. La galerie est additionnée de l'eau distillée stérile et incubé pendant 24 heures à 37°C.

1.2.4. Les Tests de la virulence

➤ **Tests enzymatiques**

a. Test coagulase

Le test coagulase est mis en évidence par la méthode en tube (**Katz, 2010**). Une colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'anse à platine puis 1ml de plasma citrate est transféré d'une manière aseptique aux tubes, ensuite les tubes sont agités à l'aide d'un agitateur vortex pour obtenir une suspension bactérienne homogène et incubés à l'étuve pendant 4h a 37°C. La formation d'un caillot indique un résultat positif.

b. Test d'hémolyse

Le test hémolyse est réalisé sur des boites Pétri contenant le milieu gélose Columbia additionné 5% de sang humaine, l'ensemencement se fait en stries sur toute la surface de gélose ensuite les boites sont incubés 24H à 37°C (**Edberg et al., 1996**).

c. Test protéase

Est réalisé sur le milieu gélose au lait écrémé, les boites sont ensemencés par stries rayonnantes et incubés 24H à 30°C. Une zone de clarification autour de la culture indique un résultat positif (**Marchal et al.,1982**).

1.2.5. La capacité à former des biofilm

La capacité à former des biofilm est décrite selon la méthode modifiée (**O Toole et Kolter, 1998**). Les biofilms sont réalisés en tubes. Les bactéries sont isolées sur milieu GN, et incubés à 28°C pendant 24H. On dépose 10ml de suspension bactérienne dans chaque tube.les tubes sont ensuite incubés 24h à 28°C. après 3 rinçages avec 10ml /tubes d'eau physiologique, les bactéries sont colorées au cristal violet 0.1% (10ml/tubes). Après 30 minutes d'incubation

à température ambiante, les tubes sont de nouveau rincés 3 fois à l'eau physiologique (10ml/tubes). Les tubes sont séchés inversement et on observe la formation de biofilm. Les résultats sont classés selon (**Jadhav et al., 2016**). en forte production de biofilm, moyenne, et faible, avec le contrôle négative.

1.2.6. Test de la résistance aux antibiotiques

Un antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélose Muller Hinton, on utilise 20 antibiotiques selon le fournisseur.

➤ Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum est celle préconisée par SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) qui consiste à prélevé à partir d'une culture de 24 heures deux à trois colonies à l'aide d'une anse et les suspendus dans 5ml d'eau physiologie dont la turbidité équivalente à 0.5 McFarland puis agiter à l'aide d'un vortex.

➤ Inoculation des géloses

Un écouvillon stérile plongé dans la suspension bactérienne et l'excès de liquide est éliminé on tournant l'écouvillon sur les parois de tube. L'ensemencement se fait en stries serrés sur toute la surface de boite pétri contenant le milieu gélosé Muller Hinton dans les trois directions (**Amel et Lemya, 2019**). On dépose les disques avec un pince stérile de manière aseptique sur la surface de la boite inoculé et séchée (cinq à six disques/ boite) puis les boites sont incubées à 37°C pendant 24H. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés, y compris le diamètre des disques. Cette mesure à été comparé avec l'échelle de sensibilité des germes (tableau 3).

Tableau 3. Echelle de sensibilité des germes (**Djabou et al., 2013**).

Inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité
0	0	Résistant
<8	±	Non sensible
8> Ø <14	+	Moyennement sensible
14> Ø <20	++	Sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

Résultats et discussion

1. Origine et identification des souches

S30, S22, S43, SE20, TE8, et X15 sont des souches isolées à partir du sols nus de la vallée de M'zab. Ils ont été identifiés par des tests priliinaires, et les systèmes API.

1.1. Observation macroscopique des colonies

Six souches bactériennes se sont développées sur le milieu gélose nutritive. Leurs principales caractéristiques sont regroupées dans le tableau (4).

Tableau 4 : Principales caractéristiques des colonies.

Caractères \ Souches	Souche S30	Souche S22	Souche S43	Souche SE20	Souche TE8	Souche X15
Forme	Irrégulière	Régulière	Régulière	Irrégulière		Régulière
Couleur	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige
Relief	Plat	Plat	Bombé	Plat	Plat	Bombé
Consistance	Sèche	Sèche	Muqueuse	Sèche	Muqueuse	Muqueuse
Opacité	Opaque	Translucide	Opaque	Opaque	Translucide	Opaque
Taille		1-4mm	2-3mm	2-3mm		1-2mm
Contour	Dentelé	Rhizoïde	Rhizoïde	Rhizoïde		Rhizoïde
Catalase	-	-	+	+	+	+
Oxydase	-	+	+	+	+	+

Presque toutes les souches sont des catalases et oxydases positive sauf les deux souches S30 et S22 leurs catalase et oxydase été différents.

1.2. Observation microscopique

Les observations microscopiques effectuées, à l'aide d'un microscope optique avec un objectif 100 à immersion.

➤ Pour la souche S30

Les colonies apparaissent sous forme unitaire, elles sont Gram positif bacilles sporulés.



Figure 1 : Aspect microscopique de la souche S30(GX100).

➤ Pour la souche S22

Les colonies apparaissent sous forme des bacilles à Gram positif.



Figure 2 : Aspect microscopique de la souche S22 (GX100).

➤ Pour la souche S43

Les colonies apparaissent sous forme des bacilles en chaînette à Gram positif sporulé.

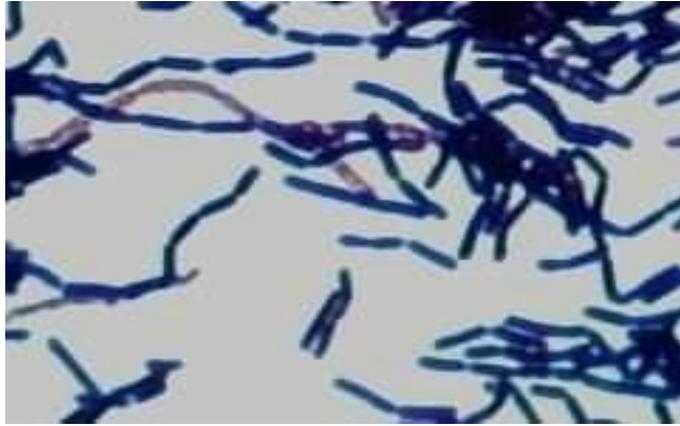


Figure 3 : Aspect microscopique de la souche S43 (GX100).

➤ Pour la souche SE20

Les colonies apparaissent sous forme des bacilles à Gram négatif.

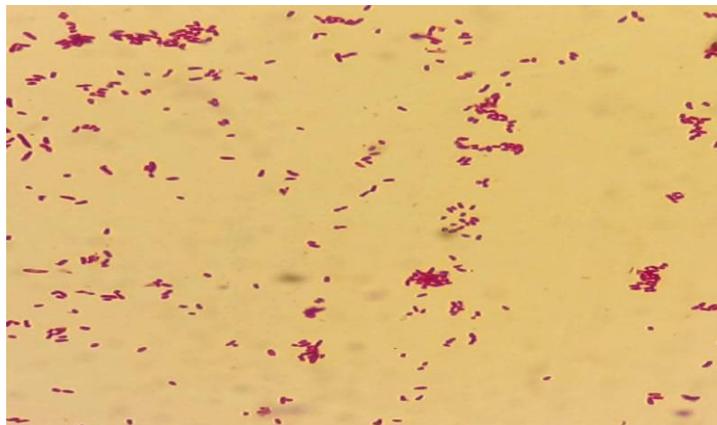


Figure4 : Aspect microscopique de la souche SE20 (GX100).

➤ Pour la souche TE8

Les colonies apparaissent sous forme des bacilles à Gram négatif.

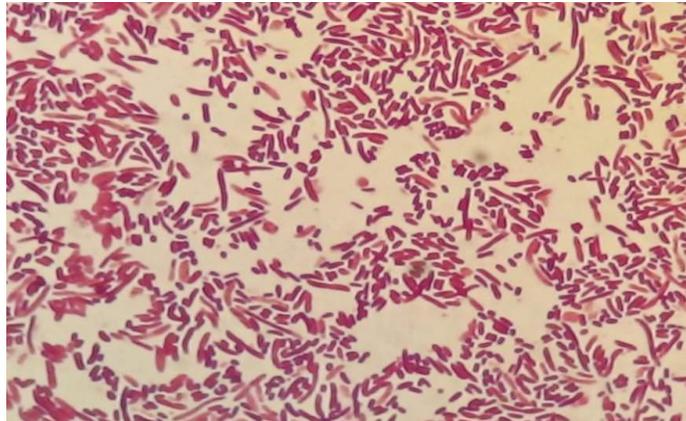


Figure 5 : Aspect microscopique de la souche TE8 (GX100).

➤ Pour la souche X15

Les colonies apparaissent sous forme des petits bacilles à Gram négatif.

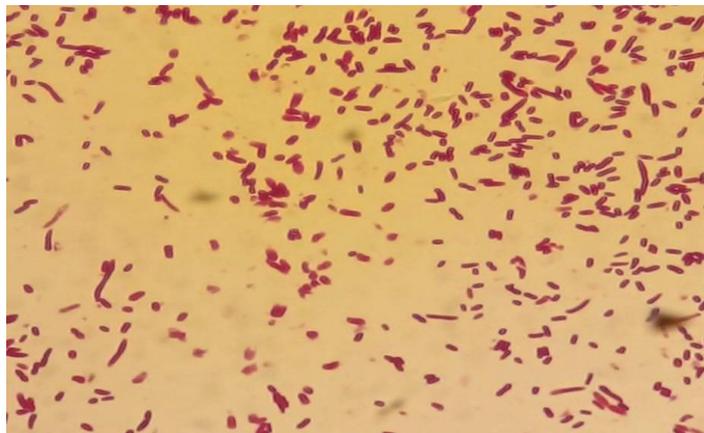


Figure 6 : Aspect microscopique de la souche X15 (GX100).

1.3. Résultat de système Api

Api 20°

Les tests de galerie Api 20° ont été réalisés dans le but de caractériser les isolats selon les substrats. Les résultats représentent que la souche S22 semble être *Brevibacillus choshinensis / centrosporus / brevis* avec une probabilité de 89.7%. la souche S30 représente *Sporosarcina pasteurii* avec une probabilité de 100%. La souche S43 semble être *Bacillus cereus* avec 51.2%, et la souche SE20 est *Aeromonas hydrophila* gr 1 avec 76.6%.

Api 20ne

L'identification par la galerie Api 20ne permet de mettre en évidence tous les caractères biochimiques. Pour la souche TE8 les résultats obtenus nous ont donné comme taxon significatif : *Aeromonas salmonicida ssp massoucida / achromogenes* avec une probabilité de 73.2%, et la souche X15 est *Pseudomonas fluorescens*.

Tableau 5. Les bactéries étudiées.

La souche	La bactérie
S30	<i>Sporosarcina Pasteurii</i>
S22	<i>Brevibacillus Brevis</i>
S43	<i>Bacillus Cereus</i>
SE20	<i>Aeromonas Hydrophila</i>
TE8	<i>Aeromonas Salmonicida massoucida</i>
X15	<i>Pseudomonas Fluorescens</i>

2. Les marqueurs de virulence

2.1. Activité enzymatique

2.1.1. L'activité coagulante

Le test de coagulase est réalisé selon la méthode en tube de **Katz, (2010)**, les résultats de coagulase été négatives pour toutes les souches.

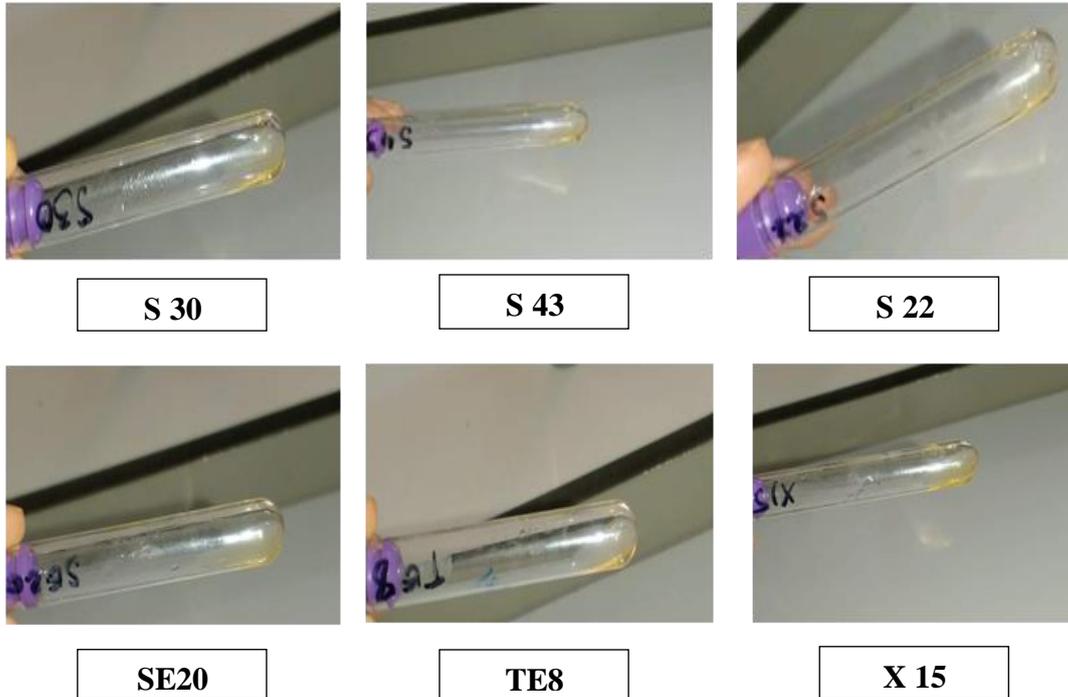


Figure7: l'activité coagulante de souches étudiés.

2.1.2. L'activité hémolytique

L'activité hémolytique est observée sur milieu gélose Columbia au sang. Les deux souches S30 et S22 ont une activité globale résultant principalement de la sécrétion d'hémolysine par ces bactéries. Les autres souches S43, SE20, TE8 et X15 ne présentent aucune activité hémolytique.

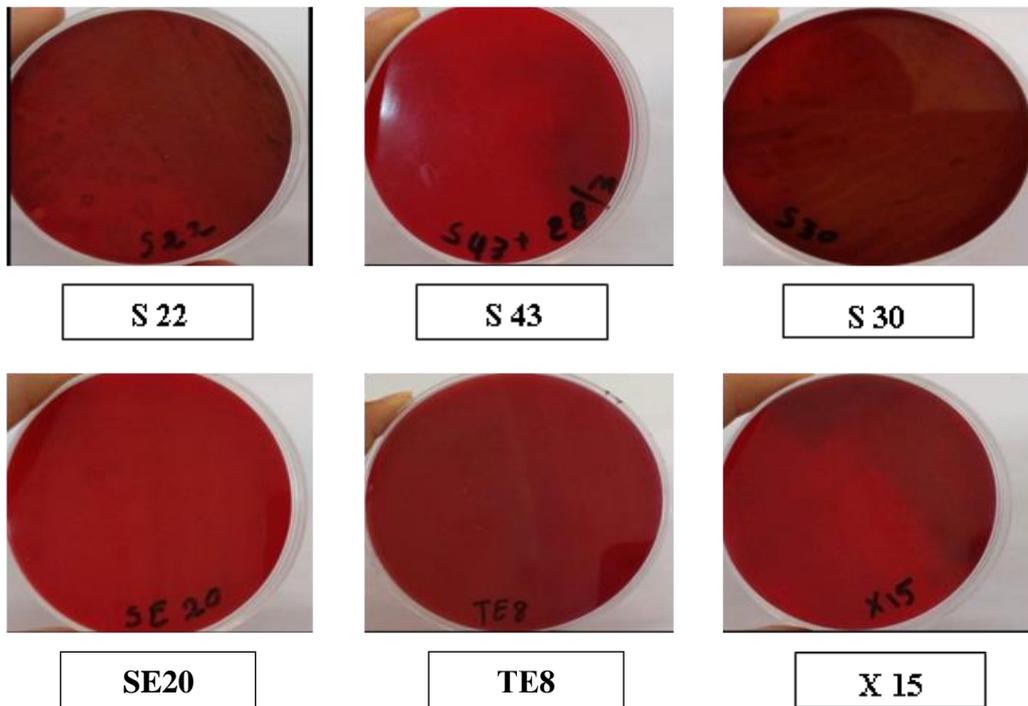


Figure.8 : l'activité hémolytique des souches étudiées.

Bacillus cereus ne présente pas une activité hémolytique, cette résultats est différent à ceux de (**Hoffmaster et al., 2006**), qui montre que la souche isolée à partir d'isolat clinique a une activité hémolytique sur gélose au sang de mouton.

Pour *Pseudomonas flueorecens*, les résultats obtenus sont différent à ceux de **Rossignol**, (2007) qui montre que la bactérie isolée à partir d'un patient atteint une infection pulmonaire a une activité hémolytique sur gélose au sang.

Pour les deux souches d'*Aeromonas*, les résultats sont différents à ceux de **Burck et al.**, (1984) qui ont montrent que les espèces d'*Aeromonas* produits d'hémolysines selon la technique de dosage.

2.1.3. L'activité protéolytique

L'activité protéolytique est observée sur le milieu gélose au lait écrémée. Les deux souches S22 et S30 ont une activité protéolytique important, tandis-que les autres souches sont protéase négative. Pour *Pseudomonas flueorecens*, ces résultats sont différents à ceux de **Rossignol**, (2007) qui rapporte que la souche a une activité protéolytique sur gélose au lait.

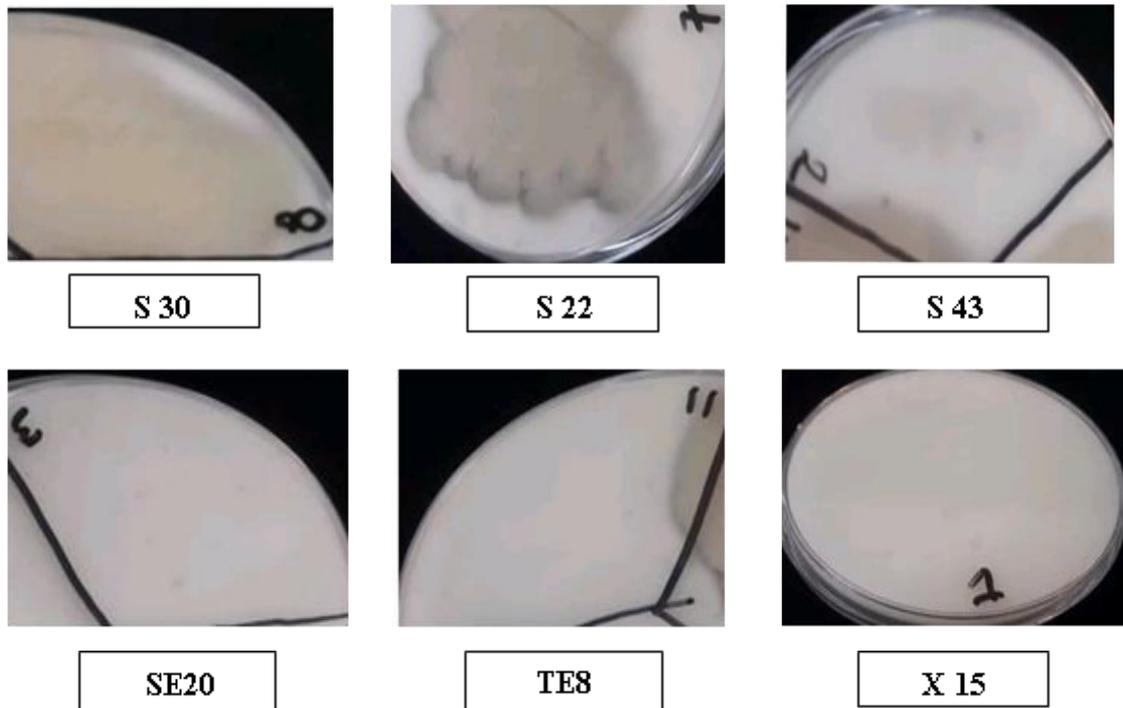


Figure.9 : l'activité protéolytique des souches étudiées.

2.2. Capacité à former des biofilm

L'adhésion des bactéries est une étape clef dans la virulence et la formation de biofilms.

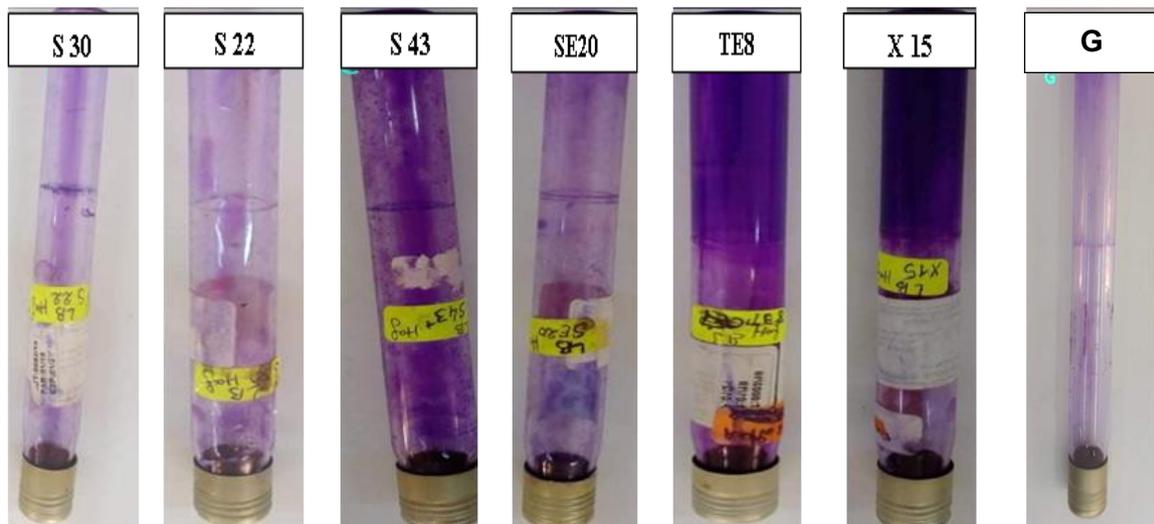


Figure10 : la Formation de biofilm de souches étudiées. G :le contrôle négative.

Pseudomonas flueorecens forme de biofilm plus important, cette résultat est complémentaire a une étude de **Rossignol, (2007)** d'une souche hospitalière selon la méthode de **O Toole et Kolter, (1998)** en microplaques de 96 puits.

Pour *Aeromonas* les deux souches forme de biofilms forte et modéré respectivement. La capacité d'*Aeromonas* a formé le biofilm été rapporté par **Igbinsa, (2014)**. d'une souche d'*Aeromonas* isolée à partir des fèces des poulets, et à été considéré comme un facteur de virulence potentiel.

Bacillus cereus forme de biofilm faible par rapport aux autres souches. Les deux bactéries *Brevibacillus brevis* et *Sporosarcina pasteurii* sont considérées comme non productrice de biofilm.

2.3. La Résistance aux antibiotiques

Toutes les six souches ont été testés vis-à-vis 20 molécules d'antibiotiques appartenant à défèrent familles dont les β - lactamines, les quinolones, les macrolides, les sulfamides, et autres.

➤ Pour *Pseudomonas flueorescens*

A partir des résultats obtenus, la souche étudié est résiste à de nombreux antibiotiques. La souche résiste à la ticarcicline, l'imipinèm, et à la gentamicine. Ces résultats sont similaires du **Rossignol , (2007)**, tandis-que la bactérie est sensible à l'aztreonam, extrêmement sensible à la ciprofloxacine. Ces résultats sont très proches de ceux obtenus par **Rossignol , (2007)**.

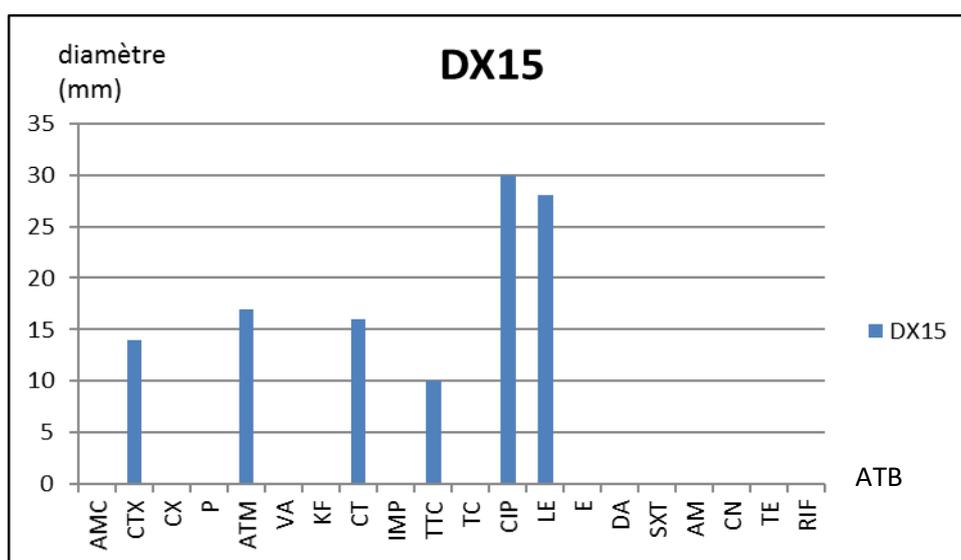


Figure 11 : Diamètre d'inhibition de la souche X15.

➤ Pour *Bacillus cereus*

La bactérie résiste aux Aztreonam, mais sensible à la Gentamicine et Ciprofloxacine. Ces résultats sont complémentaires à ceux de (Yu *et al.*, 2019) selon la méthode de diffusion sur disque de la souche isolée à partir des végétaux in china.

Une autre étude de (Gao *et al.*, 2018) ont rapportés des résultats très proches concernant la résistance aux β -lactames, dont l’Ampiciline, l’Aztreonam, et le Benzylpéniciline d’une souche isolée à partir de lait pasteurisée. Même résultats observés pour la sensibilité de la souche à l’Imipinème, Gentamicine, et Ciprofloxacine. Cette résistance aux quelques β -lactames est due à la production de β -lactamases.

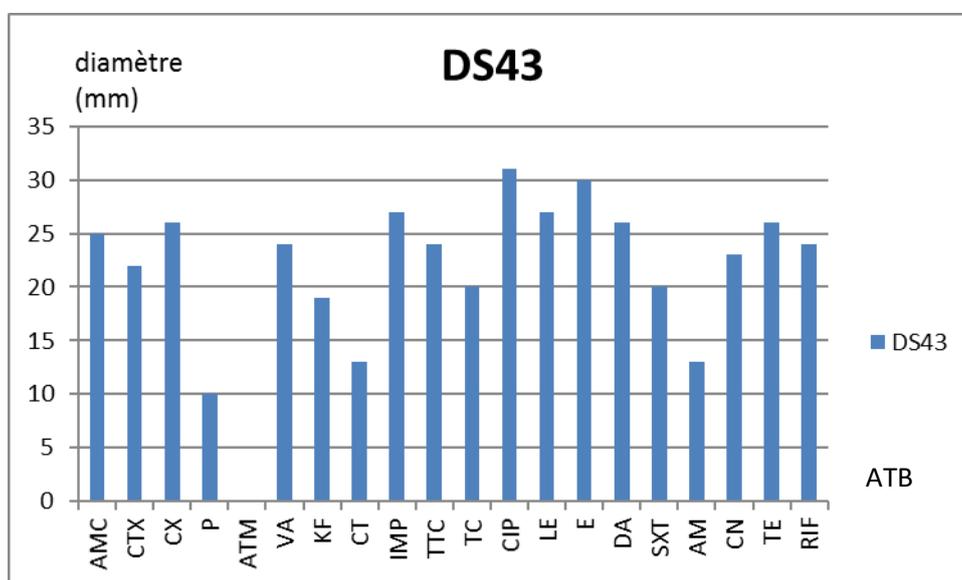


Figure 12 : Diamètre d’inhibition de la souche S43.

➤ Pour *Aeromona hydrophila*

A partir des résultats obtenus, la bactérie résiste à nombreux β -lactamines dont l’Amoxiciline acide clavulanique, Benzylpéniciline, Vancomycine, Céfaloine, Ticarcilline, et Ampiciline.

Ces résultats sont similaires à une autre étude (Zhou *et al.*, 2019), qui rapporte une résistance élevée à l’antibiotiques amoxiciline +acide clavulanique et aux sulfaméthoxazole+ triméthoprim.

Les quinolones, les sulfamides, et certains β -lactamines ont un effet important sur *Aeromonas hydrophila*. Cela est confirmé par d’autre étude de (Igbiosa, 2014). D’une souche isolé à partir des fèces de poulets.

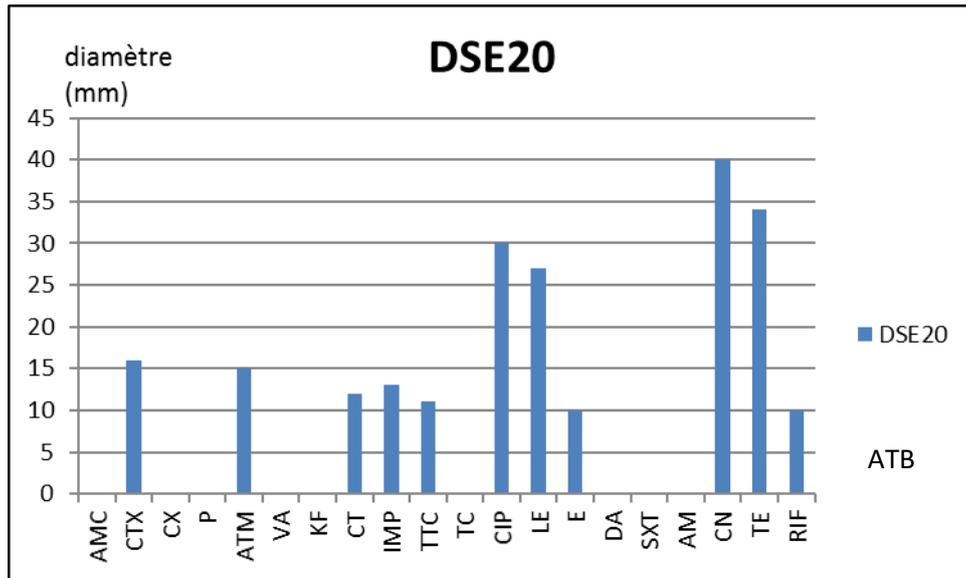


Figure13 : Diamètre d'inhibition de la souche SE20.

➤ Pour *Aeromonas Salmonicida*

D'après les résultats, la bactérie est résistante à de nombreux antibiotiques dont les β -lactamines y compris l'ampiciline, vancomycine, ticarcilline, et l'amoxiciline+acide clavulanique. Tandis que les quinolones, et les macrolides ont une effet très important sur cette bactérie.

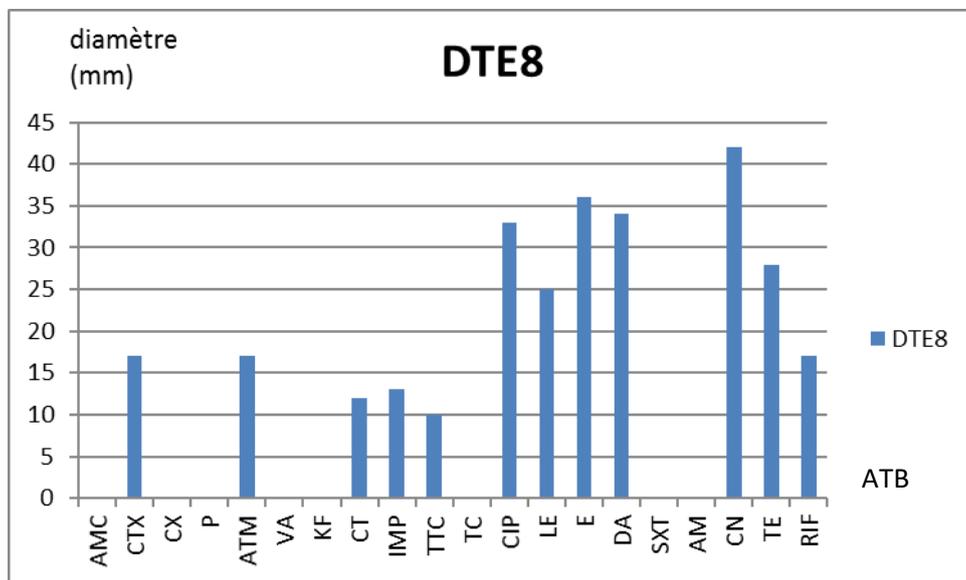


Figure 14 : Diamètre d'inhibition de la souche TE8.

➤ Pour *Sporosarcina pasteurii*

La bactérie est sensible à plusieurs antibiotiques de la famille de β -lactamine dont l'amoxicilline +acide clavulanique, imipinème, vancomycine, et l'ampicilline mais l'aztréonam ne possède aucune effet sur cette bactérie. Elle est également très sensible à divers antibiotiques dont les quinolones, les macrolides, et les sulfamides.

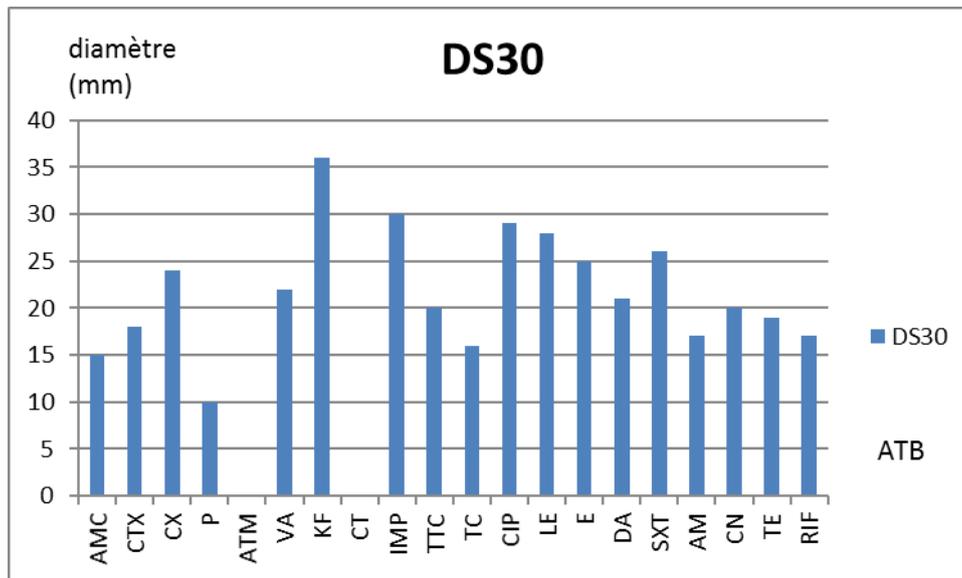


Figure15 : Diamètre d'inhibition de la souche S30.

➤ Pour *Brevibacillus brevis*

La bactérie devient extrêmement sensible aux quinolones, les macrolides, et aux sulfamides dont lévofloxacine, ciprofloxacines, erythromycine, et sulfaméthoxazole +triméthoprime respectivement. Une sensibilité élevée est observée chez de nombreux β -lactamines.

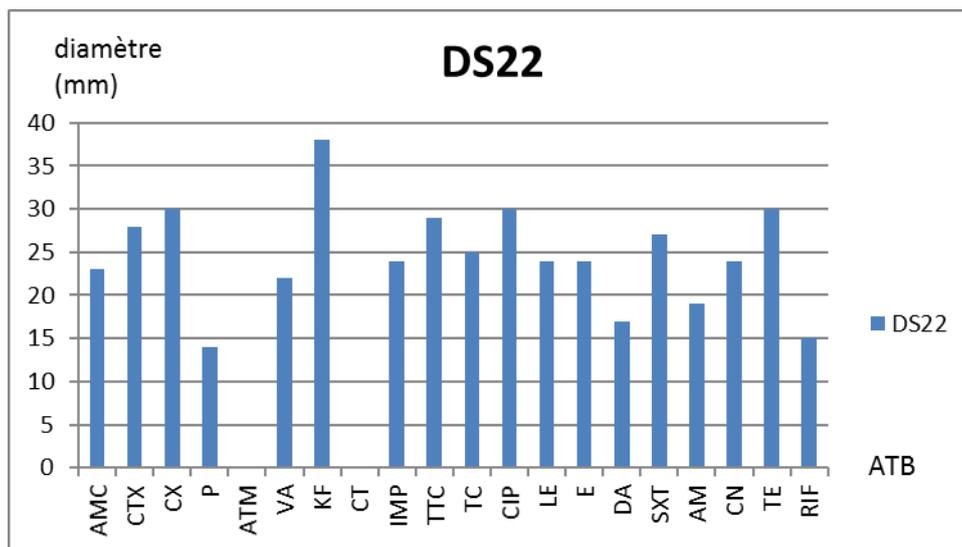


Figure16 : Diamètre d'inhibition de la souche S22.

Conclusion

Conclusion

Les souche S30, S22, S43, SE20, TE8, et X15. Identifiées comme appartenant aux espèces suivants *Sporosarcina pasteurii*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, et *Pseudomonas fluorescens* ont été isolés à partir de sols nus. Ils sont capables de pousser à 37°C et à 28°C et présentes des caractères phénotypiques et biochimiques différents. Ce travail avait pour objectif de déterminer les facteurs de virulence élaborés par ces bactéries.

L'espèce *Pseudomonas fluorescens* ne présente aucune activité hémolytique, coagulante, et protéolytique. mais elle est résistante aux nombreux antibiotiques, et produit de biofilm très important qui est considéré comme un facteur de virulence. Pour les deux espèces qui appartenant au genre *Aeromonas*, ne produit aucune activité extracellulaire parmi les activités étudiées mais ils résistent à nombreux familles d'antibiotiques. D'après les résultats on constate que *Bacillus cereus* n'est pas virulente, tandis-que les autres espèces y compris *Brevibacillus brevis*, et *Sporosarcina pasteurii* sont potentiellement virulents. L'étude de ces souches bactériennes qui ont une activités PGPR du point de vue de son virulences, doit aider à prendre tous les précautions avant l'étulisation de ces souches.

Références bibliographiques

Ait-Zine, I. (2019). TOXINES BACTERIENNES.

Amel, D. S. G., & Lemya, M. (2019). Activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Fumaria officinalis* L.

Belkadi, Z., & Koliai, Y. (2016). *Isolement de bactéries rhizosphériques à activité antagoniste et essai dans le biocontrôle de Botrytis cinerea sur la tomate* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

Benabid, R. (2009). *Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à Pseudomonas aeruginosa* (Doctoral dissertation, Reims).

Bouchard-Rochette, M. (2020). *Bacillus pumilus et Bacillus subtilis pour lutter contre la pourriture grise chez la tomate et le concombre de serre.*

Boutal, H. (2017). *Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques* (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*, 67(8), 3703-3713p.

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *The Journal of infectious diseases*, 184(3), 337-344.

Djabou, N., Lorenzi, V., Guinoiseau, E., Andreani, S., Giuliani, M. C., Desjobert, J. M., ... & Muselli, A. (2013). Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control*, 30(1), 354-363p.

Dommergues, Y., & Mangenot, F. (1970). Ecologie microbienne du sol.

Duthie, E. S. 1954. Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. *J. Gen. Microbiol.* 10:427-436p.

Dykhuisen, D. (2005). Species numbers in bacteria. *Proceedings. California Academy of Sciences*, 56(6 Suppl 1), 62p.

Edberg, S. C., Gallo, P., & Kontnick, C. (1996). Analysis of the virulence characteristics of bacteria isolated from bottled, water cooler, and tap water. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 9(2), 67-77p.

- Esmay, P. A., Billington, S. J., Link, M. A., Songer, J. G., & Jost, B. H. (2003).** The Arcanobacterium pyogenes collagen-binding protein, CbpA, promotes adhesion to host cells. *Infection and immunity*, 71(8), 4368-4374p.
- Floug, Q. (2020).** *Hirudothérapie et risques infectieux au CHU Amiens-Picardie: proposition de mise en place de protocoles de surveillance bactériologique de l'eau de conservation et de décontamination des sangsues* (Doctoral dissertation).
- Gao, T., Ding, Y., Wu, Q., Wang, J., Zhang, J., Yu, S., ... & Wu, H. (2018).** Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of Bacillus cereus isolated from pasteurized milk in China. *Frontiers in microbiology*, 9, 533p.
- Ghosh, S., & O'Connor, T. J. (2017).** Beyond paralogs: the multiple layers of redundancy in bacterial pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 467p.
- Hoffmaster, A. R., Hill, K. K., Gee, J. E., Marston, C. K., De, B. K., Popovic, T., ... & Jackson, P. J. (2006).** Characterization of Bacillus cereus isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to Bacillus anthracis and harbor B. anthracis virulence genes. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3352-3360p.
- Igbinsosa, I. H. (2014).** Antibigram profiling and pathogenic status of Aeromonas species recovered from Chicken. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 481-485p.
- Isenberg, H. D. (1988).** Pathogenicity and virulence: another view. *Clinical microbiology reviews*, 1(1), 40-53p.
- Jadhav, A., Dohe, V., Kagal, A., & Bharadwaj, R. (2016).** ROLE OF BIOFILMS IN STAPHYLOCOCCUS COLONISING INTRAVENOUS CATHETERS. *International Journal of Current Research and Review*, 8(11), 15.
- Katz, D. S. (2010).** Coagulase test protocol. *American Society for Microbiology Laboratory Protocols*. Available online: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol>, 3220.
- Khalifa, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V., & Khedher, M. (2011, August).** Les facteurs de virulence de Pseudomonas aeruginosa: mécanismes et modes de régulations. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 69, No. 4, pp. 393-403p).

Khelif, C. D., & Chegrouche, S. (2020). *Etude des propriétés chimiques, électrochimiques et bioactives des fractions retenues de la plante Résida alba L* (Doctoral dissertation, Université laarbi tebessi tebessa).

Leclerc H, Izard D, Husson M O, Wattre P, Jakubczak E, 1983- Microbiologie générale. Ed. Doin, Paris, 369p.

Lê Van, A. (2011). Potentiel évolutif du pouvoir pathogène de *Venturia inaequalis* en lien avec la domestication du pommier et l'utilisation de résistances quantitatives en amélioration variétale (Doctoral dissertation, Université d'Angers).

MAHAMAT, O. O., Tidjani, A., Savadogo, A., MAHAMAT, A. A., Somda, M. K., & Traore, A. S. (2013). Isolement et caractérisation des bactéries productrices des biofilms issues des produits alimentaires. *Review of Industrial Microbiology Sanitary and Environnemental*, 7(2), 187-210.

Marchal, N., Bourdon, J. L., & Richard, C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

MARILLEY, L., VOGT, G., & ARAGNO, M. (2007). Diversité bactérienne du sol et de la rhizosphère et effet d'une augmentation en CO₂ atmosphérique Soil and rhizosphere bacterial diversity and effect of the atmospheric CO₂ content. In *Symposium*,(479) (pp. 1-7).

Meliani, A. (2012). *Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des Pseudomonas fluorescens* (Doctoral dissertation, PhD thesis, université d'Oran, Algérie).

O'Connell, D. P., T. Nanavaty, D. McDevitt, S. Gurusiddappa, M. Höök, and T. J. Foster. (1998). The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* has a Ca²⁺ -dependent inhibitory site. *J. Biol. Chem.* 273:6821–6829p.

O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, 28(3), 449-461p.

Palleroni, (1992). Lakhdari, M. B., Bennecer, M. Z. E., & Bensalama, O. (2021). Etude de la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Panizzi, P., R. Friedrich, P. Fuentes-Prior, W. Bode, and P. E. Bock. 2004. The staphylocoagulase family of zymogen activator and adhesion proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:2793–2798p.

Paolozzi, L. (2015). *Microbiologie: biologie des procaryotes et de leurs virus.* Dunod.).

Paula A. Esmay, Stephen J. Billington, Malen A. Link, J. Glenn Songer, and B. Helen Jost, 2003.

Pilet, C. H., Bourdon, J. L., Toma, B., Marchal, N., & Balbastre, C. (1979). Bactériologie médicale et vétérinaire systématique bactérienne, 2ème édition. 437 pages. *Doin éditeurs.*

Poulin, R., & Combes, C. (1999). The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology today (Personal ed.)*, 15(12), 474-475p.

Received for publication, July 30, 2007, and in revised.

Rossignol, G. (2007). *Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de Pseudomonas fluorescens: activité hémolytique et variation phénotypique* (Doctoral dissertation, Université de Rouen).

Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268p.

Russell, W., & Herwald, H. (Eds.). (2005). *Concepts in bacterial virulence* (Vol. 12). Karger Medical and Scientific Publishers.

Ryma, L. A. B. I. O. D. (2016). *Valorisation des huiles essentielles et des extraits de Satureja calamintha nepeta: activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide* (Doctoral dissertation, Université BADJI Mokhtar Annaba).

Soussy, C. J., Squinazi, F. J., & Duval, J. (1975). Les aeromonas en pathologie humaine: A propos de vingt observations personnelles. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 5(1), 11-19p.

Todd, J. C., A. H. Sanford, and B. B. Wells. (1953). Clinical diagnosis by laboratory methods, 12th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.

Van Der Woude, M. W., & Bäumlér, A. J. (2004). Phase and antigenic variation in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 17(3), 581-611p.

Wong, C. Y. F., Mayrhofer, G., Heuzenroeder, M. W., Atkinson, H. M., Quinn, D. M., & Flower, R. L. P. (1996). Measurement of virulence of Aeromonads using a suckling mouse model of infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *15*(4), 233-241p.

Yu, P., Yu, S., Wang, J., Guo, H., Zhang, Y., Liao, X., ... et Ding, Y. (2019). *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, *10*, 948p.

Zheng, C., Li, L., Ge, H., Meng, H., Li, Y., Bei, W., et Zhou, X. (2018). Role of two-component regulatory systems in the virulence of *Streptococcus suis*. *Microbiological research*, *214*, 123-128p.

Zhou, Y., Yu, L., Nan, Z., Zhang, P., Kan, B., Yan, D., & Su, J. (2019). Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC infectious diseases*, *19*(1), 1-9p.

Annexes

Annexe 1 : Coloration de Gram

Afin de nous déterminer le gram des souches ; nous faisons les étapes suivantes :

- 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 1 minute ;
- 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).

Pour voir si les bactéries possèdent des spores nous faisons une Coloration au vert de Malachite. (Ryma, 2016).

Annexe 2 : Les solutions et réactifs

1. Préparation de réactive oxydase

- Dans un tube, dissoudre une pointe de couteau de N, N, N, N tétraméthyl 1-4 phénylène diamine dans 5ml d'eau distillé.
- 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 6h.

2. Réactive des API

Réactif VP 1 KOH : 40 g et H₂O : 100 ml

Réactif VP 2 Alpha-naphtol : 6 g et Ethanol : 100 ml

Eau physiologique : NaCl :9g et H₂O :1l

Annexe 3 : Milieu de culture

1. Milieu gélose nutritive

- Gélose nutritive :23g
- H₂O : 1l

2. Milieu gélose columbia au sang

- Mélange de peptone :23g
- Amidon :1g
- NaCL :5g
- Agar :10
- sang :5%
- H₂O :1l

3. Milieu Mueller-Hinton (g/l)

- Infusion de viande de boeuf :300
- Hydrolysate de caséine :17.5
- Amidon :1.5
- Gélose :17

4. Milieu gélose au lait écrimé

- Gélose nutritive stérile :20ml
- Lait écrimé stérile :10ml

5. Milieu LB (g/l)

- Tryptone :10
- Extrait de levure :5
- NaCL :5

Annexe 4 : Résultat de système API



Figure 1. Résultat de l'identification d'une souche de *Sporosarcina pasteurii* par la galerie API 20^e.



Figure 2. Résultat de l'identification d'une souche de *Brevibacillus brevis* par la galerie API 20^e.



Figure 3. Résultat de l'identification d'une souche de *Bacillus cereus* par la galerie API 20^e.



Figure 4. Résultat de l'identification d'une souche d'*Aeromonas hydrophila* par la galerie API 20°.



Figure 5. Résultat de l'identification d'une souche d'*Aeromonas salmonicida* ssp *masoucida* par la galerie API 20ne.



Figure 6. Résultat de l'identification d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* par la galerie API 20ne.

Annexe 5 : Résultats d'antibiogramme

Tableau 1. Résultat d'antibiogramme pour S30.

Antibiotiques	Charge (μg)	Diamètre critique	Résistance
AMC	30	15	Sensible
CTX	30	18	Sensible
CX	30	24	Extremement S
P	10	10	Moyennement S
ATM	30	0	Résistant
VA	30	22	Extremement S
KF	30	36	Extremement
CT	10	0	Résistant
IMP	10	30	extremement
TTC	85	20	sensible
TC	75	16	sensible
CIP	5	29	extremement
LE	5	28	extremement
E	15	25	extremement
DA	2	21	extrememnt
SXT	25	26	extremement
AM	10	17	sensible
CN	10	20	sensible
TE	30	19	sensible
RIF	5	17	sensible

Tableau 2. Résultat d'antibiogramme pour S43.

Antibiotiques	Charge	Diamètre critique	Résistance
AMC	30	25	Extremement S
CTX	30	22	Extremement S
CX	30	26	Extremement S
P	10	10	Moyennement S
ATM	30	0	Résistant
VA	30	24	Extremement S
KF	30	19	Sensible
CT	10	13	Moyennement S
IMP	10	27	Extremement S
TTC	85	24	Extremement S
TC	75	20	Sensible
CIP	5	31	Extremement S
LE	5	27	Extremement S
E	15	30	Extremement S
DA	2	26	Extremement S
SXT	25	20	Sensible
AM	10	13	Moyennement S
CN	10	23	Extremement S
TE	30	26	Extremement S
RIF	5	24	Extremement S

Tableau 3. Résultat d'antibiogramme pour S22.

Antibiotiques	Charge	Diamètre	Résistance
AMC	30	23	Extremement S
CTX	30	28	Extremement S
CX	30	30	Extremement S
P	10	14	Moyennement S
ATM	30	0	Résistant
VA	30	22	Extremement S
KF	30	38	Extremement S
CT	10	0	Résistant
IMP	10	24	Extremement S
TTC	85	29	Extremement S
TC	75	25	Extremement S
CIP	5	30	Extremement S
LE	5	24	Extremement S
E	15	24	Extremement S
DA	2	17	Sensible
SXT	25	27	Extremement S
AM	10	19	Sensible
CN	10	24	Extremement S
TE	30	30	Extremement S
RIF	5	15	Sensible

Tableau 4. Résultat d'antibiogramme pour X15.

Antibiotiques	Charge	Diamètre	Résistance
AMC	30	0	Résistant
CTX	30	14	Moyennement S
CX	30	0	Résistant
P	10	0	Résistant
ATM	30	17	Sensible
VA	30	0	Résistant
KF	30	0	Résistant
CT	10	16	Sensible
IMP	10	0	Résistant
TTC	85	10	Moyennement S
TC	75	0	Résistant
CIP	5	30	Extremement S
LE	5	28	Extremement S
E	15	0	Résistant
DA	2	0	Résistant
SXT	25	0	Résistant
AM	10	0	Résistant
CN	10	0	Résistant
TE	30	0	Résistant
RIF	5	0	Résistant

Tableau 5. Résultat d'antibiogramme pour TE8.

Antibiotiques	Charge	Diamètre	Résistance
AMC	30	0	Résistant
CTX	30	17	Sensible
CX	30	0	Résistant
P	10	0	Résistant
ATM	30	17	Sensible
VA	30	0	Résistant
KF	30	0	Résistant
CT	10	12	Moyennement S
IMP	10	13	Moyennement S
TTC	85	10	Moyennement S
TC	75	0	Résistant
CIP	5	33	Extrêmement S
LE	5	25	Extrêmement S
E	15	36	Extrêmement S
DA	2	34	Extrêmement S
SXT	25	0	Résistant
AM	10	0	Résistant
CN	10	42	Extrêmement S
TE	30	28	Extrêmement S
RIF	5	17	Sensible

Tableau 6. Résultat d'antibiogramme pour SE20.

Antibiotiques	Charge	Diamètre	Résistance
AMC	30	0	Résistant
CTX	30	16	Sensible
CX	30	0	Résistant
P	10	0	Résistant
ATM	30	15	Sensible
VA	30	0	Résistant
KF	30	0	Résistant
CT	10	12	Moyennement S
IMP	10	13	Moyennement S
TTC	85	11	Moyennement S
TC	75	0	Résistant
CIP	5	30	Extremement S
LE	5	27	Extremement S
E	15	10	Moyennement S
DA	2	0	Résistant
SXT	25	0	Résistant
AM	10	0	Résistant
CN	10	40	Extremement S
TE	30	34	Extremement S
RIF	5	10	Moyennement S