



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème :

**Evaluation de l'activité antifongique et antibactérienne vis-à-vis  
de bactéries multirésistantes chez une collection de souches  
d'origine aquatiques**

*Soutenu le : 09/07/2023*

*Présenté par :*

✚ Mlle. BOUZOUIDJA Ibtissem  
✚ Mlle. AZOUT Imene

**Devant le jury :**

Mme. LOUNACI L.	MCB	USDB1	Présidente
Mme. MOHAMED MAHMOUD F.	MCA	USDB1	Examinatrice
Mme. TOBAL SEGHIR- GUENOUNE S.	MAA	USDB1	Promotrice
Mme. HAMAIDI F.	Professeur	USDB1	Co-Promotrice

Année universitaire : 2022/2023

## Remerciements

*C'est avec un grand plaisir qu'on réserve ces lignes en signe de reconnaissance à tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à rendre ce travail possible.*

*Notre profonde gratitude va en premier, à **Allah** le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience d'arriver à mettre ce travail à terme.*

*Nous remercions également notre promotrice **Mme, TOBAL SEGHIR-GUENOUNE S** ; maître assistante à l'université Blida 1, pour son aide, sa disponibilité, ses orientations et pour la confiance qu'elle a mise en nous, qu'elle trouve ici toute notre gratitude et surtout notre parfaite considération de l'intérêt qu'elle portait à ce travail depuis le début.*

*Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements à notre Copromotrice **Pr, HAMAIDI F** ; professeur à l'université de Blida 1, pour l'aide précieuse qu'elle nous ait apportées.*

*Puis, nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à l'ensemble des membres du jury :*

*Nous tenons à gratifier **Mme. LOUNACI L** ; maître de conférences à l'université Blida1, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à **Mme, MOHAMED MAHMOUD F** ; maître de conférences à l'université Blida 1, pour l'intérêt qu'elle a porté à notre travail en acceptant de l'examiner.*

*Nous remercions beaucoup **Mr, TEFACHI** et **Mlle HASSI** pour leurs aides et leurs soutiens*

*Nos remerciements vont aussi aux doctorants **Mr BOUTEKFA**, **Mlle HENNI**, **Mr SEBSI** et **Mr HAMMEDECH**.*

# *Dédicaces*

*Je tiens à dédier ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leurs amours, leurs soutiens et leurs conseils durant toutes mes années d'étude, merci d'être toujours là.*

*À mes très chères sœurs **Marwa** et **Imene** et son mari **Abdelkader** et à mon cher et unique frère **Mohamed** et sa femme **Imene** pour leurs encouragements.*

*À mon cher fiancé **Abdessalem**, pour ses encouragements, son soutien et ses judicieux conseils.*

*À mon binôme, sœur et meilleure amie **Imene** et sa famille.*

*À mes amis et mes collègues **Nafissa**, **Sarah**, **Imene**, **Zin el Abidine**, **Raounek**, **Ines**, **Maroua** et à toute la promotion 2023 de Microbiologie de l'université Saad Dahlab de Blida.*

*À tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près à l'élaboration de ce mémoire de fin d'étude.*

*Enfin à vous qui prenez la peine de lire ce mémoire.*

***Ibtissem***

# *Dédicaces*

*Je tiens à dédier ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leurs amours, leurs soutiens et leurs conseils durant toutes mes années d'étude, merci d'être toujours là.*

*A ma deuxième maman **Ma grand-mère** je t'aime infiniment. Ta tendresse et ta bienveillance ont façonné la personne que je suis aujourd'hui.*

*A mes piliers de force **Hamza et Moncef**, a la joie de ma vie **Zin el dîne** Je vous aime plus que les mots ne puissent le dire.*

*A mes très chère sœur **Amani, Chiraz, Lynda**. Merci d'être là pour moi, Votre soutien et votre présence sont des trésors inestimables dans ma vie.*

*À mon binôme, sœur et meilleure amie **Ibtissem** qui a partagé avec moi le bonheur et le malheur, et sa famille.*

*À toute la promotion 2023 de Microbiologie de l'université Saad Dahlab de Blida.*

*À tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près à l'élaboration de ce mémoire de fin d'étude.*

*Enfin à vous qui prenez la peine de lire ce mémoire.*

*Imene*

## Liste des tableaux

<b>Tableau VI</b> : Profil de résistance des bactéries tests .....	22
<b>Tableau XII</b> : Résultats de la galerie Api 20NE .....	30
<b>Tableau XIII</b> : Résultats de la galerie Api NH.....	31
<b>Tableau I</b> : Développement de nouveaux antibiotiques (Vidal,2021).....	38
<b>Tableau II</b> : Les mécanismes de résistances (Kappor <i>et al.</i> ,2017).....	39
<b>Tableau III</b> : Les germes tests.....	41
<b>Tableau IV</b> : Appareillage et Verreries .....	41
<b>Tableau V</b> : Résultats de la mesure de température et du pH.....	45
<b>Tableau VII</b> : Résultats de la méthode des disques sur agar .....	48
<b>Tableau VIII</b> : Résultats de la méthode de diffusion des puits d'agar .....	50
<b>Tableau IX</b> : Résultats d'études macroscopique des souches .....	52
<b>Tableau X</b> : Résultats de la coloration de Gram .....	54
<b>Tableau XI</b> : Résultats des tests biochimiques.....	56
<b>Tableau XIV</b> : Résultats de la recherche du type respiratoire .....	61

## Liste des figures

<b>Figure n°1</b> : Développement des nouveaux antibiotiques en fonction du temps (CDC, 2013 ; Vidal, 2021) graphe fait par nos soins. ....	4
<b>Figure n°3</b> : Les étapes de prélèvement (Originale) .....	10
<b>Figure n°10</b> : Résultats des mesures de température in situ.....	20
<b>Figure n°11</b> : Résultats des mesures de pH.....	21
<b>Figure n°13</b> : Répartitions des résultats de la technique des disques de diffusion sur agar ....	23
<b>Figure n°14</b> : Activité antifongique contre <i>A. brasiliensis</i> réalisée par la méthode des disques (Photo originale) : a) inhibition de <i>A. brasiliensis</i> par S18 et S20 ; b) inhibition de <i>A. brasiliensis</i> par S11 et S14B1 ; c) inhibition de <i>A. brasiliensis</i> par S29B1 ; d) inhibition de <i>A. brasiliensis</i> par S17B2 et S17B4.....	24
<b>Figure n°15</b> : Activité antifongique contre <i>C. albicans</i> réalisée par la méthode des disques : a) inhibition de <i>C. albicans</i> par S17B4 ; b) inhibition de <i>C. albicans</i> par S14B1 ; c) inhibition de <i>C. albicans</i> par S20. (Photo originale) .....	24
<b>Figure n°16</b> : Résultats de la technique de diffusion des puits d'agar. (Photo originale).....	25
<b>Figure n°17</b> : Les souches ayant une activité antifongique contre <i>C. albicans</i> par la méthode de puits (Photo originale) : a) S14B1 ; b) S1B2-1 ; c) S17B4 ; d) S29B1 et S30B1. ....	26
<b>Figure n°18</b> : Inhibition de <i>A. brasiliensis</i> par S14B1 par la méthode de puits. (Photo originale) .....	26
<b>Figure n°19</b> : Résultats de la coloration différentielle de Gram .....	27
<b>Figure n°20</b> : Résultats de la coloration de Gram (Photo originale): a) Cocci à Gram négatif, b) bacilles à Gram négatif, c) coccobacilles à Gram négatif, d) diplocoques à Gram négatif, e) Cocci à Gram positif, f) bacilles à Gram positif, g) Coccobacilles à Gram positif, h) diplocoques à Gram positif, i) tétra coques à Gram positif .....	28
<b>Figure n°21</b> : Résultats de la présence des spores chez 4 souches de <i>Bacillus</i> (Photo originale): a) S1B2-2 ; b) S17B4 ; c) S20 ; d) S29B3 .....	32
<b>Figure n°2</b> : Situation géographique des prélèvements de l'eau de source (Google maps,2023) .....	42
<b>Figure n°4</b> : Mesure de la température (Originale).....	43
<b>Figure n°5</b> : Mesure de pH par le pH-mètre (Photo originale) .....	43
<b>Figure n°6</b> : Test de chlore par la méthode de DPD (Photo originale).....	43
<b>Figure n°7</b> : test de catalase (Photo originale) .....	44
<b>Figure n°8</b> : test d'oxydase (Photo originale) .....	44
<b>Figure n°9</b> : Expression des résultats de la recherche du type respiratoire su milieu VF.....	44
<b>Figure n°12</b> : Résultats de l'isolement et purification des souches .....	46
<b>Figure n°22</b> : Résultats de confirmation de profil de résistance des BMR.....	47

## Liste des abréviations

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**Api 20NE** : Appareils et Procédés d'Identification 20 Non Entérobactéries

**Api NH** : Appareils et Procédés d'Identification Neisseria, Haemophilus

**ASR** : Anaérobies Sulfito-Réducteurs

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BHIB** : Brain Heart Infusion Bouillon

**BMR** : Bactéries MultiRésistantes

**CCA** : Culture Coliformes Chromocult

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CMF** : concentration Minimale Fongicide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DO** : Densité Optique

**DPD** : N, N-Diethyl-P-Phenylenediamine

**GNO** : Gélose Nutritive Ordinaire

**H2O2** : Peroxyde d'hydrogène

**MH** : Mueller Hinton

**MS** : Milieu Sabouraud

**OMS** : L'Organisation Mondiale de la Santé

**TI** : Taux d'Inhibition

**VF** : Viande de Fois

## Résumé

L'objectif assigné à la présente étude est l'évaluation de l'activité antifongique et antibactérienne vis-à-vis de bactéries multirésistantes chez une collection de souches d'origine aquatique.

La recherche des activités antibactériennes et/ ou antifongiques des souches isolées à partir des échantillons d'eau a été réalisé par deux méthodes : la méthode des disques de diffusion sur agar et la méthode de diffusion des puits d'agar. Ces méthodes ont été réalisées contre trois souches bactériennes multirésistantes : *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, et deux souches fongiques : *Candida albicans* (ATTC 10231) et *Aspergillus brasiliensis* (ATTC 16404).

À partir de 31 échantillons d'eau prélevés dans six régions de la wilaya de BLIDA, nous avons isolé et purifié un total de 50 souches bactériennes. Les résultats du criblage des activités antibactériennes et / ou antifongiques ont montré que certaines souches isolées, telles que S11 et S18 (*Brevundimonas vesicularis*), S14B1 (*Pseudomonas fluorescens*), S17B2, S17B4, et S20 (*Bacillus spp*) ainsi que S29B1 (*Aeromonas hydrophila*) présentaient des activités antifongiques contre les souches tests, notamment contre *A. brasiliensis* avec des diamètres d'inhibitions allant du 10 à 24 mm pour la méthode des disques, et du 7 à 19mm pour la méthode des puits. D'autre part, les souches S1B2-2, S17B4, S20, S29B3 (*Bacillus spp*) et S14B1 (*Pseudomonas fluorescens*) ont montré une activité antifongique contre *C. albicans* avec des zones d'inhibitions allant du 13 à 17mm pour la méthode des disques, et du 8 à 23mm pour la méthode des puits. Cependant, aucune des souches isolées n'a montré une activité antibactérienne contre les bactéries multirésistantes testées.

**Mots clés :** Activité antibactérienne, activité antifongique, souches aquatiques, bactéries multirésistantes.

## Abstract

The aim of the present study was to evaluate the antifungal and antibacterial activity of a collection of strains of aquatic origin against multi-resistant bacteria.

The antibacterial and antifungal activities of strains isolated from water samples were investigated using two methods: the agar disk diffusion method and the agar-well diffusion method. These methods were performed against three multi-resistant bacterial strains: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, and two fungal strains: *Candida albicans* (ATTC 10231) and *Aspergillus brasiliensis* (ATTC 16404).

From 31 water samples collected from six regions of the BLIDA province, we isolated and purified 50 bacterial strains. Results obtained by screening for antibacterial and antifungal activity showed that certain isolated strains, such as S11 and S18 (*Brevundimonas vesicularis*), S14B1 (*Pseudomonas fluorescens*), S17B2, S17B4, and S20 (*Bacillus spp*) as well as S29B1 (*Aeromonas hydrophila*) exhibited antifungal activity against test fungal strains, notably *A. brasiliensis* with inhibition diameters ranging from 10 to 24mm for the disc method and from 7 to 19mm for the well method. On the other hand, strains S1B2-2, S17B4, S20, S29B3 (*Bacillus spp*) and S14B1 (*Pseudomonas fluorescens*) showed antifungal activity against *C. albicans* with inhibition zones ranging from 13 to 17mm for the disk method, and from 8 to 23mm for the well method. However, none of the isolated strains showed antibacterial activity against multi-resistant bacteria.

**Keywords:** Antibacterial activity, antifungal activity, aquatic strains, multi-resistant bacteria.

## ملخص

الهدف المحدد لهذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للفطريات والبكتيريا ضد البكتيريا المتعددة المقاومة في مجموعة من السلالات الأصلية المائية

تم إجراء بحث عن الأنشطة المضادة للبكتيريا والفطريات للسلالات المعزولة من عينات الماء باستخدام طريقتين: طريقة انتشار الأقراص على الأجار وطريقة انتشار الثغور الأجارية. تم تنفيذ هذه الطرق ضد ثلاث سلالات بكتيرية متعددة المقاومة *Acinetobacter baumannii* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae*، وسلالتين فطريتين *Candida albicans* (ATTC 10231) و *Aspergillus brasiliensis* (ATTC 16404)

من خلال 31 عينة من الماء التي تم جمعها من ست مناطق في ولاية البليدة، قمنا بعزل مجموعة من 50 سلالة بكتيرية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال فحص الأنشطة المضادة للبكتيريا والفطريات أن بعض السلالات المعزولة، مثل S11 و S18 و *Brevundimonas vesicularis*، و S14B1 و *Pseudomonas fluorescens* و S17B2، S17B4، و S20 و *Bacillus spp*، بالإضافة إلى S29B1 و *Aeromonas hydrophila* أظهرت نشاطاً ضد السلالات الفطرية المختبرة، خاصة ضد *A. brasiliensis* قطرات تثبيط تتراوح بين 10 و 24 ملم لطريقة الأقراص، ومن 7 إلى 19 مم لطريقة الثغور. من ناحية أخرى، أظهرت السلالات S1B2-2 و S17B4 و S20 و *Bacillus spp* و S29B3 و *Bacillus spp* و S14B1 و *Pseudomonas fluorescens* نشاطاً مضاداً للفطريات ضد *C. albicans* مع مناطق تثبيط تتراوح بين 13 و 17 ملم لطريقة الأقراص، ومن 8 إلى 23 ملم لطريقة الثغور. ومع ذلك، لم تظهر أي من السلالات المعزولة أي نشاط مضاد للبكتيريا ضد البكتيريا متعددة المقاومة.

**الكلمات المفتاحية:** النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات، السلالات المائية، البكتيريا المقاومة للعديد من الأدوية

# Tables des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

## **I. Synthèse bibliographique**

I.1. Antibiotiques.....	3
I.1.1. Définition .....	3
I.1.2. Mécanismes d'action des antibiotiques .....	3
I.1.3. Développement de nouveaux antibiotiques .....	3
I.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	4
I.2.1. Définition .....	4
I.2.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	4
I.2.3. Bactéries multirésistantes.....	5
I.2.3.1. Définition .....	5
I.2.3.2. Principales bactéries multirésistantes .....	5
I.2.4. Impact de la résistance bactérienne sur la santé publique.....	6
I.3. Molécules bioactives.....	6
I.3.1. Définition .....	6
I.3.3. Méthodes de recherche des molécules bioactives antifongiques et antibactériennes .....	7
I.4. Activité antibactérienne et antifongique .....	7
I.4.1. Définition .....	7
I.4.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne .....	8
I.4.2.1. Méthodes quantitatives .....	8
I.4.2.2. Méthodes qualitatives .....	8
I.4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique.....	8

## **II. Matériel et méthodes**

II.1. Matériel.....	10
II.1.1. Matériel biologique.....	10
II.1.2. Matériel non biologique.....	10
II.2. Méthodes .....	10
II.2.1. Méthodes d'échantillonnage.....	10

II.2.2. Technique de prélèvement et de transport .....	10
II.2.3. Analyse physico-chimiques .....	11
II.2.3.1. Paramètres physiques .....	11
a. Mesure de la température .....	11
b. Mesure de pH .....	11
II.2.3.2. Paramètre chimique .....	11
a. Dosage de chlore résiduel .....	11
II.2.4. Techniques d'isolement et de purification des souches bactériennes.....	12
II.2.4.1. Isolement par la méthode de filtration sur membrane .....	12
II.2.4.2. Purification des souches non-entérobactéries sur gélose (CCA).....	12
II.2.5. La conservation des souches.....	12
II.2.6. Revivification des souches .....	13
II.2.8. Recherche d'activités antibactériennes et antifongiques .....	13
II.2.8.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques des BMR .....	13
II.2.8.2. Préparation des inocula des souches.....	13
a. Préparation des inocula de souches bactériennes tests (BMR) .....	13
b. Préparation des inocula de souches fongiques tests .....	14
c. Préparation des inocula des souches isolées .....	14
II.2.8.3. Technique des disques de diffusion sur agar .....	14
II.2.8.4. Technique de diffusion de puits d'agar .....	15
II.2.7. Identification microbiologique classique.....	15
II.2.7.1. Examen macroscopique .....	15
II.2.7.2. Examen microscopique.....	16
a. Coloration différentielle de Gram .....	16
b. Tests biochimiques .....	16
II.2.9. Identification microbiologique des souches performantes .....	17
II.2.9.1. Identification des bacilles à Gram négatifs non entérobactéries .....	17
II.2.9.2. Identification des cocci Gram négatif .....	18
II.2.9.3. Identification de <i>Bacillus spp.</i> .....	18
a. Test physiologique .....	18

### **III. Résultats et discussion**

III.1. Résultats .....	20
III.1.1. Résultats des analyses physico-chimiques .....	20
III.1.1.1. Paramètres physiques .....	20
a. Température .....	20
b. pH.....	20
III.1.1.2. Paramètre chimique.....	21
a. Dosage de chlore .....	21
III.1.2. Résultats d'isolement et de purification des souches bactériennes .....	21
III.1.3. Résultats de criblage des activités antibactériennes et antifongiques .....	21
III.1.3.1. Confirmation du profil de résistance des BMR.....	21
III.1.3.2. Activité antibactérienne.....	22
III.1.3.3. Activité antifongique.....	23
III.1.3.3.1. Résultats d'inhibition par la technique des disques de diffusion sur agar .....	23
III.1.3.3.2. Résultats d'inhibition par la technique de diffusion des puits d'agar .....	25
III.1.4. Résultats de l'identification microbiologique classique.....	27
III.1.4.1. Résultats de l'examen macroscopique .....	27
III.1.4.2. Résultats de l'examen microscopique .....	27
III.1.4.2.1. Résultats de la coloration de Gram .....	27
III.1.4.2.2. Résultats des tests biochimiques .....	29
a. Résultats des tests oxydase et catalase .....	29
III.1.4.3. Résultats de l'identification des souches performantes.....	29
III.1.4.3.1. Résultats de l'identification des bacilles à Gram négatif non-entérobactéries.....	29
a. Résultats de la galerie Api 20NE .....	29
III.1.4.3.2. Résultats de l'identification des cocci à Gram négatifs .....	31
a. Résultats de la galerie Api NH.....	31
III.1.4.3.3. Identification du genre <i>Bacillus spp.</i> .....	31
a. Résultats de l'identification des <i>Bacillus</i> par élimination des bactéries ASR.....	31
b. Résultats de la recherche du type respiratoire .....	31
c. Mise en évidence de la présence de spore.....	31
III.2. Discussion .....	33
<b>Conclusion .....</b>	<b>36</b>

**Références bibliographiques**

**Annexes .....38**

# **Introduction**

## **Introduction**

Les antibiotiques ont révolutionné la médecine en permettant le traitement efficace des infections bactériennes (**Carle, 2009**). Ces médicaments agissent en perturbant spécifiquement les processus vitaux des bactéries, tels que la synthèse de la paroi cellulaire, la réplication de l'ADN et la biosynthèse des protéines (**Ishnaiwer, 2022**). Cependant, l'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques a conduit à l'émergence de mécanismes de résistance chez de nombreuses souches bactériennes (**Sanders et al., 2011**).

En effet, depuis quelques décennies, la résistance aux antibiotiques, l'émergence et la propagation de bactéries multirésistantes (BMR) constituent un défi majeur pour la santé publique à l'échelle mondiale (**Van Duin et Paterson, 2016**). Les BMR ont la capacité de survivre et de se multiplier malgré l'utilisation d'antibiotiques, ce qui limite l'efficacité de ces médicaments vitaux (**Ibrahimi, 2020**).

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel qui résulte de l'adaptation des bactéries à leur environnement (**Van Duinet et Paterson, 2016**). Cependant, l'utilisation excessive et abusive d'antibiotiques accélère ce processus (**Chaouch et al., 2014**). Les mécanismes de résistance comprennent la production d'enzymes capables de dégrader les antibiotiques, la modification des cibles d'antibiotiques, la diminution de l'entrée des médicaments dans les cellules bactériennes et l'efflux actif des antibiotiques en d'hors des cellules (**Rowe-Magnus et Mazel, 2006**).

Face à cette menace croissante, la recherche de nouveaux médicaments antibactériens est devenue une priorité. Cependant, il faut reconnaître que le développement de nouveaux antibiotiques est un processus long, coûteux et incertain (**Dimasi et al., 2003**). De plus, les bactéries ont montré une capacité remarquable à développer rapidement une résistance contre de nouveaux médicaments.

Selon **Tangcharoensathien (2017)**, la résistance aux antibiotiques pourrait causer environ 10 millions de décès prématurés d'ici 2050, avec une perte économique pouvant atteindre 100 000 milliards de dollars pour l'économie mondiale. Cette situation est aggravée par le manque d'antibiotiques robustes, ce qui entraîne l'émergence d'infections presque incurables et ne laisse aux cliniciens aucune alternative fiable pour traiter les patients infectés. Il est donc impératif de trouver des alternatives aux antibiotiques conventionnels et d'explorer de nouvelles sources de molécules bioactives.

Les milieux aquatiques, en raison de leur biodiversité et de leur potentiel encore inexploité, offrent une riche variété de microorganismes susceptibles de produire des molécules bioactives utiles pour lutter contre les bactéries multirésistantes (**Ameen et al., 2021**). Les bactéries marines sont les microorganismes les plus prometteurs pour la découverte de nouvelles molécules ayant des propriétés antibactériennes. (**Butler et al., 2013**). Néanmoins, les eaux douces aussi méritent une attention particulière en tant que sources potentielles de microorganismes producteurs de molécules bioactives. Bien que leur surface soit faible, leur richesse spécifique est étonnamment élevée, abritant 130 000 des 2 millions d'espèces connues (**Bilian et al., 2010**). Grâce à leur biodiversité et leur potentiel inexploité, ils offrent une grande diversité de microorganismes capables de produire des molécules bioactives utiles pour lutter contre les bactéries multirésistantes (**Ameen et al., 2021**).

Dans ce contexte, cette recherche vise à évaluer l'activité antifongique et antibactérienne vis-à-vis de souches bactériennes multirésistantes chez une collection de souches d'origine aquatique. L'objectif principal de notre étude est d'explorer cette collection de souches afin de révéler des éventuelles molécules bioactives antifongiques et / ou anti-bactéries Bactéries multirésistantes (BMR). Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes qualitatives, les plus couramment utilisées : la première méthode est la méthode des disques de diffusion sur agar, qui permet de mesurer la zone d'inhibition de croissance des microorganismes en présence des souches testées. La seconde méthode est la méthode de diffusion dans des puits d'agar, qui permet d'évaluer l'inhibition des souches testées en fonction de leur capacité à diffuser à partir d'un puits dans le milieu de culture.

Les résultats de cette étude pourront avoir une incidence significative sur la santé publique. La mise en évidence de molécules bioactives dotées d'activités antibactériennes et / ou antifongiques pourrait contribuer à élargir l'arsenal thérapeutique disponible pour traiter les infections microbiennes.

# **I. Synthèse bibliographique**

## **I.1. Antibiotiques**

### **I.1.1. Définition**

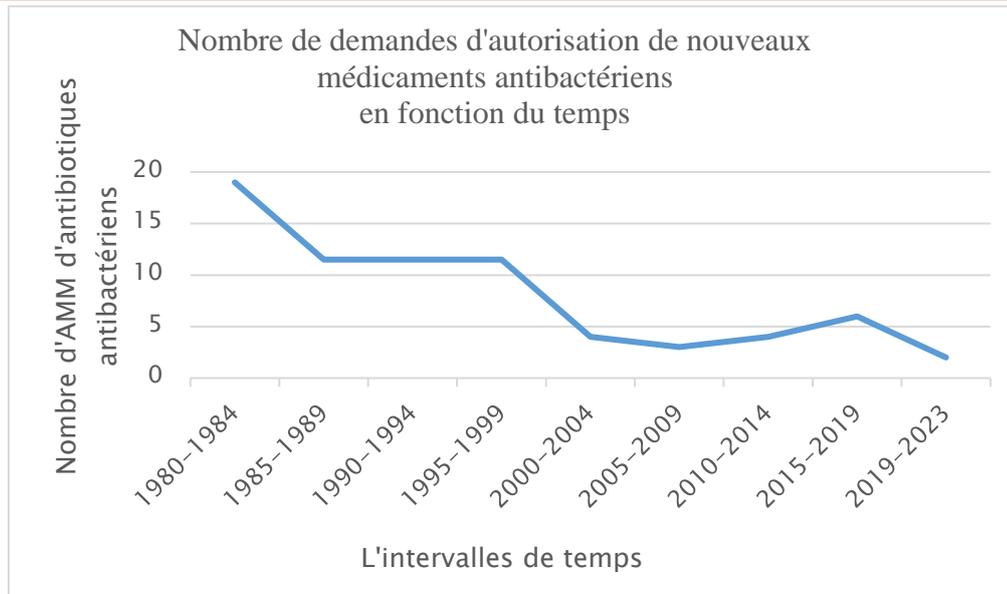
Les antibiotiques sont des substances chimiques d'origine naturelle, synthétique, ou semi-synthétique (**Bbosa et al., 2014**). Ils ont pour but de diminuer ou de stabiliser la quantité de bactéries présentes au niveau du site infectieux (**Caruba et Jaccoulet, 2015**). Selon leur mode d'action, les antibiotiques peuvent être qualifiés de bactéricides s'ils ont la capacité de tuer les bactéries, ou de bactériostatiques s'ils empêchent simplement leur prolifération (**Ziadi, 2010**).

### **I.1.2. Mécanismes d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques ont des cibles variées sur les bactéries. Ces agents inhibent la multiplication, la croissance et la destruction des bactéries par divers mécanismes. Certains d'entre eux incluent l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, la perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire, l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'inhibition de la synthèse des protéines, et l'action en tant qu'anti-métabolites (**Merzoug et Chikhi, 2018**).

### **I.1.3. Développement de nouveaux antibiotiques**

Depuis les débuts des années **2000**, le flux de nouveaux antibiotiques s'est asséché, laissant seulement deux nouvelles molécules sur le marché entre **2008** et **2012**. Utiliser des antibiotiques, même si cela est justifié, encourage la résistance bactérienne. Cette diminution de nouveaux antibiotiques est due à un modèle économique qui ne permet pas un retour suffisant sur l'investissement, ce qui dissuade la recherche et le développement de nouvelles molécules. Cependant, de nouveaux antibiotiques ont été développés ces dernières années pour les hôpitaux (**voir Tableau I, annexe I**), et environ 50 molécules sont actuellement en cours d'étude, même si beaucoup seront abandonnées en raison de leur inefficacité ou de leur toxicité (**Vidal,2021**).



**Figure n°1** : Développement de nouveaux antibiotiques en fonction du temps (CDC, 2013 ; Vidal, 2021) graphe fait par nos soins.

## I.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

### I.2.1. Définition

La résistance bactérienne aux antibiotiques désigne la capacité de certaines bactéries à persister malgré la sollicitation d'un antibiotique. Elle est un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale au 21<sup>ème</sup> siècle (WHO, 2021). Cette résistance peut être naturelle, inhérente à toutes les souches d'un genre ou d'une espèce, ou acquise, présente dans une proportion variable de souches d'une même espèce. La résistance naturelle est portée par le chromosome et se transmet verticalement lors de la division cellulaire, tandis que la résistance acquise peut être transmise verticalement ou horizontalement, via des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les intégrons (Zhang et Feng, 2016 ; Rozwandowicz *et al.*, 2018).

### I.2.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques sont variés et complexes. Les bactéries peuvent développer différents mécanismes pour neutraliser les antibiotiques, tels que l'inactivation de l'antibiotique, l'altération ou la modification de la cible médicamenteuse, la réduction de la consommation d'antibiotiques, l'efflux actif et la formation de biofilm (Ishnaiwer, 2022) (Tableau II, annexe I).

## I.2.3. Bactéries multirésistantes

### I.2.3.1. Définition

Les bactéries multirésistantes sont caractérisées par l'accumulation de mécanismes de résistance acquis à l'égard de plusieurs familles d'antibiotiques, ce qui les rend résistantes à un grand nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. (Muller, 2017) (Résistance à au moins 3 classes majeures d'antibiotiques) (Pilmis, 2021). Les bactéries, qu'elles soient impliquées dans les infections communautaires ou nosocomiales, peuvent toutes développer une multirésistance. Bien que les bactéries multirésistantes ne soient pas plus agressives que leurs homologues non résistantes, elles compliquent considérablement le traitement médical (Cohen et Rollet, 2013).

### I.2.3.2. Principales bactéries multirésistantes

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a diffusé en février 2017 une liste de bactéries multirésistantes, représentant une menace majeure à l'échelle mondiale (Ibrahimi, 2020 ; Sally, 2021). Cette liste comprend 11 éléments, classés selon trois priorités :

- **Urgence critique**

- *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*).
- *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).
- Les Entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) résistantes aux carbapénèmes.

- **Urgence élevée**

- *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) résistant à la vancomycine.
- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) résistant à la méthicilline.
- *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) résistant à la clarithromycine.
- Les espèces de *Campylobacter* et les salmonelles résistantes aux fluoroquinolones.
- *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) résistant aux céphalosporines et aux fluoroquinolones.

- **Urgence moyenne**

- *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) non sensible à la pénicilline.
- *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) résistant à l'ampicilline.
- Les espèces de *Shigella* résistantes aux fluoroquinolones.

#### **I.2.4. Impact de la résistance bactérienne sur la santé publique**

La résistance bactérienne aux antibiotiques a une incidence importante sur la santé publique à l'échelle mondiale :

1. Aggravation des infections ce qui peut entraîner des complications plus graves, une hospitalisation plus longue et un risque de mortalité plus élevé.
2. Une augmentation des coûts de santé car les infections résistantes aux antibiotiques nécessitent entre autres des traitements plus coûteux
3. Une réduction de l'efficacité des traitements existants et limitation des options de traitement disponibles.
4. Une augmentation de la morbidité et de la mortalité en raison de l'augmentation de la gravité et de la difficulté de traitement des infections.
5. Une diminution de l'efficacité des interventions médicales, telles que la chirurgie et la chimiothérapie, en raison de l'augmentation des infections postopératoires et de l'incapacité à traiter les infections concomitantes (WHO, 2021).

### **I.3. Molécules bioactives**

#### **I.3.1. Définition**

Les molécules bioactives sont des composés d'origine biologique qui présentent des propriétés bénéfiques pour la santé (Krishna *et al.*, 2020). Les ressources naturelles, telles que les plantes, les animaux et les microorganismes ont été largement étudiées pour leur potentiel en tant qu'agents antiviraux, antifongiques, antimicrobiens, anti-tumoraux, antioxydants, anti-anxiolytiques et cicatrisants. Des outils chimiques et biotechnologiques ont permis la découverte de plusieurs composés prometteurs (Bérdy, 2005). Contrairement aux biomolécules et aux nutriments, les métabolites secondaires ne sont pas essentiels au fonctionnement de l'organisme. (Taale *et al.*, 2016).

#### **I.3.3. Méthodes de recherche des molécules bioactives antifongiques et antibactériennes**

Les méthodes de recherche des molécules bioactives antifongiques et antibactériennes sont basées sur l'exploration de différentes sources naturelles ou synthétiques, ainsi que sur l'identification et la caractérisation des composés actifs. Parmi ces méthodes, on peut citer :

1-La méthode par criblage ; qui consiste à tester l'activité antifongique ou antibactérienne de nombreux extraits ou substances sur des souches de champignons ou de bactéries cibles, en utilisant des techniques comme la diffusion en gélose, la dilution en milieu liquide ou solide, ou le biofilm (**Jean-Cyr, 2023**).

2- La méthode de fractionnement bioguidé ; qui consiste à séparer les composés d'un extrait ou d'une substance selon leur polarité, leur taille ou leur charge, puis à tester l'activité antifongique ou antibactérienne de chaque fraction obtenue, jusqu'à l'isolement du ou des composés actifs (**Simard, 2013**).

3-La méthode par chimie combinatoire ; qui consiste à synthétiser une grande diversité de molécules à partir de briques élémentaires, puis à tester l'activité antifongique ou antibactérienne de chaque molécule synthétisée, en utilisant des techniques comme la microdilution en milieu liquide ou solide (**Arnaud, 2023**).

4- La méthode génomique et métabolomique ; qui consiste à analyser le génome et le métabolome de microorganismes producteurs de molécules bioactives, puis à identifier les gènes et les voies métaboliques impliqués dans la biosynthèse des composés antifongiques ou antibactériens (**Paris et al., 2008**).

## **I.4. Activités antibactériennes et antifongiques**

### **I.4.1. Définition**

L'activité antibactérienne et / ou antifongique est la capacité de certaines substances à lutter contre une bactérie et / ou un champignon, soit en les tuant (action bactéricide/ action fongicide), soit en ralentissant leur croissance (action bactériostatique/ action fongistatique)

### **I.4.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne :**

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des substances, qui peuvent être classées en deux catégories : les méthodes quantitatives et les méthodes qualitatives.

#### **I.4.2. 1. Méthodes quantitatives**

Elles visent à mesurer le degré d'inhibition ou de destruction des bactéries par la substance testée. Elles permettent de déterminer la concentration minimale inhibitrice (**CMI**)

ou la concentration minimale bactéricide (**CMB**) de la substance. Parmi ces méthodes, on peut citer :

**La méthode par dilution** ; qui consiste à préparer des séries de dilutions de la substance dans un milieu de culture liquide, puis à y inoculer les bactéries et à observer leur croissance ou leur absence de croissance.

**La méthode par microdilution** ; qui est une variante de la méthode par dilution, mais qui utilise des volumes plus faibles et des plaques à puits. (**Rios et al.,1988**)

#### **I.4.2. 2. Méthodes qualitatives**

Elles visent à mettre en évidence la présence ou l'absence d'un effet antibactérien de la substance testée. Elles ne permettent pas de quantifier l'activité antibactérienne, mais sont plus simples et rapides à réaliser. Parmi ces méthodes, on peut citer :

**La méthode par diffusion en gélose**, qui consiste à déposer la substance à tester sur un disque de papier ou directement sur un milieu solide gélosé inoculé avec les bactéries, puis à observer l'apparition ou non d'une zone d'inhibition autour du disque ou du point de dépôt. (**Rios et al.,1988**)

#### **I.4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique**

Les méthodes d'évaluation de l'activité antifongique sont similaires à celles utilisées pour l'activité antibactérienne, mais elles sont adaptées aux caractéristiques des champignons, tels que les levures ou les moisissures. Parmi ces méthodes, on peut citer :

- **La méthode par dilution en milieu liquide**, qui consiste à préparer des séries de dilutions de la substance dans un milieu de culture liquide, puis à y inoculer les champignons et à observer leur croissance ou leur absence de croissance. Cette méthode permet de déterminer la (**CMI**) ou la concentration minimale fongicide (**CMF**) de la substance. (**Bertholom ,2023**).

- **La méthode par dilution en milieu solide**, qui consiste à déposer la substance sur un disque de papier ou directement sur un milieu solide gélosé inoculé avec les champignons, puis à observer l'apparition ou non d'une zone d'inhibition autour du disque ou du point de dépôt. Cette méthode permet de déterminer le taux d'inhibition (**TI**) de la substance. (**Vinod et al.,2010**)

- **La méthode par microdilution en milieu liquide**, qui est une variante de la méthode par dilution en milieu liquide, mais qui utilise des volumes plus faibles et des plaques de 96 puits.

Cette méthode permet de déterminer la (**CMI**) ou la (**CMF**) de la substance. (**Bertholom,2023**).

- **La méthode par microdilution en milieu solide**, qui est une variante de la méthode par dilution en milieu solide, mais qui utilise des volumes plus faibles et des plaques de 96 puits. Cette méthode permet de déterminer le (**TI**) de la substance. (**Vinod et al.,2010**)

## **II. Matériel et méthodes**

Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida durant une période de 4 mois allant du 1<sup>er</sup> février au 1<sup>er</sup> juin.

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1. Matériel Biologique**

- 31 échantillons d'eau d'origine aquatique ont été prélevés.
- Les germes tests figurant dans le tableau **III (Annexe II)**

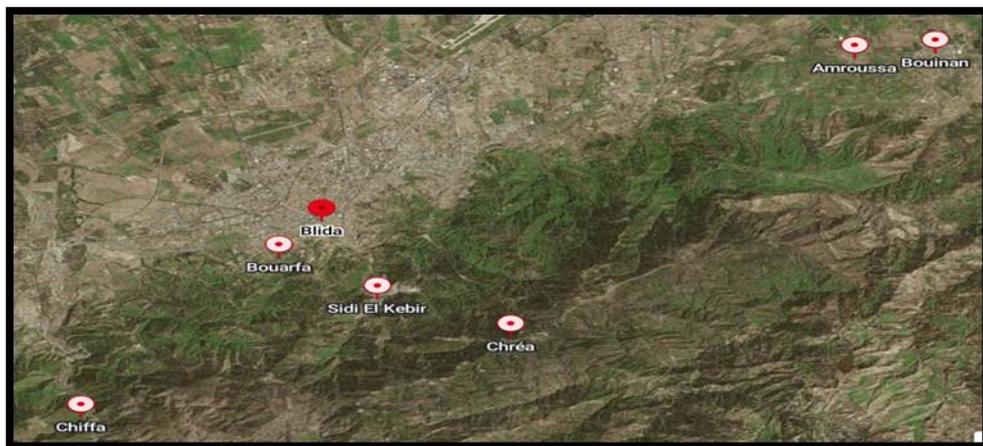
### **II.1.2. Matériel non biologique**

Le matériel non biologique habituellement trouvé dans un laboratoire de microbiologie est résumé dans le tableau IV (Annexe II)

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Méthode d'échantillonnage**

À fin de réaliser notre étude, trente-et-un échantillon d'eau ont été prélevés à partir de 6 sites distincts.



**Figure n°2:** Situation géographique des prélèvements de l'eau de source (Google maps,2023).

### **II.2.2. Technique de prélèvement et de transport**

Les échantillons sont prélevés dans des flacons stériles de **200 ml** après avoir été rincés plusieurs fois avec de l'eau à prélever (**Figure n°3**). Après étiquetage, les flacons sont transportés promptement au laboratoire dans une boîte à isolation thermique.



Figure n°3 : Les étapes de prélèvement (Originale).

### II.2.3. Analyses physico-chimiques

La température est mesurée immédiatement *in situ* alors que le pH et le Chlore sont mesurés une fois arrivés au laboratoire.

#### II.2.3.1. Paramètres physiques

##### a. Mesure de la température

**Principe** : la température est mesurée à l'aide d'un thermomètre.

**Mode opératoire** : une fois que le thermomètre est immergé à l'intérieur de l'échantillon, on patiente jusqu'à ce qu'il se stabilise.

**Lecture des résultats** : l'appareil affiche la valeur de la température en degré Celsius (°C) (Figure n°4, Annexe IV).

##### b. Mesure du pH (NF T90-008)

**Principe** : la détermination de la valeur du pH repose sur la mesure de la différence de potentiel d'une cellule électrochimique à l'aide d'un pH-mètre.

**Mode opératoire** : 100 ml de l'échantillon à analyser sont transvasés dans un bécher, puis l'électrode du pH-mètre est immergée et laissée jusqu'à la stabilisation de la valeur de pH.

**Lecture des résultats** : la valeur du pH est lue directement sur l'afficheur du pH-mètre (Figure n°5, Annexe IV).

#### II.2.3.2. Paramètre chimique

##### a. Dosage du Chlore résiduel (Norme ISO7393/3)

**Principe** : la méthode de détermination du chlore utilise le test DPD (N, N-Diethyl-P-Phenylenediamine).

**Mode opératoire** : l'eau à analyser est agitée et un certain volume est introduit dans un tube à essai préalablement rincé. Puis un comprimé de DPD est introduit.

**Lecture des résultats** : Lorsqu'il y a présence de chlore libre dans l'eau, le DPD forme un complexe rougeâtre. On compare la couleur du tube contenant l'échantillon d'eau avec celle du comparateur pour avoir le taux de chlore. La concentration de chlore libre est exprimée en **mg/L** d'eau à analyser (**Figure n°6, Annexe IV**).

## **II.2.4. Techniques d'isolement et de purification des souches bactériennes**

### **II.2.4.1. Isolement des souches par la méthode de filtration sur membrane**

**Principe** : la méthode de filtration sur membrane implique l'isolement des bactéries présentes dans un échantillon d'eau en utilisant un filtre dont les pores sont plus petits que les bactéries (**0,45 µm**). Le filtre retient les bactéries contenues dans l'eau. Il est ensuite déposé sur le milieu de culture coliformes Chromocult (CCA). (**Giacobbo et Bernardes, 2022**).

**Mode opératoire** : il est impératif de procéder au lavage et à la stérilisation par autoclavage des entonnoirs (500 ml) et des supports de filtre après chaque série d'analyses ou interruption des manipulations. La membrane de filtration est délicatement déposée à l'aide d'une pince décontaminée en positionnant le quadrillage vers le haut et en le centrant parfaitement sur la plaque-support. 100 ml d'eau à analyser est versée dans chaque entonnoir puis la pompe à filtration est mise en marche. Le filtre est déposé ensuite sur le milieu CCA contenu dans une boîte de Pétri de 5 cm de diamètre, le quadrillage vers le haut, en évitant les bulles d'air afin que tout le filtre soit en contact avec le milieu de culture. Incubez à 37°C pendant 24 heures (**Pakpour et Horgan, 2021**).

**Lecture des résultats** : après incubation, les colonies de coliformes fécaux et totaux se distinguent par une coloration bleue et rose respectivement. Cependant, d'autres colonies peuvent présenter une coloration différente, indiquant la présence d'espèces bactériennes non entérobactéries.

### **II.2.4.2. Purification des souches non-entérobactéries sur la gélose (CCA)**

Les souches sélectionnées sont purifiées par plusieurs repiquages successifs sur milieu CCA. Ce milieu permet de visualiser de façon distinctive différents types de bactéries, notamment *E. coli* et les coliformes, éventuellement présents dans l'eau. L'objectif du repiquage sur CCA est tout à fait contraire de l'utilisation habituelle de ce milieu. Nous

avons souhaité s'assurer que nos isolats soient exempts de germes de contamination. Les souches sont incubées à **30°C** pendant **24 heures**.

### **II.2.5. Conservation des souches**

Les souches isolées puis purifiées sont conservées dans des bouillons nutritifs BHIB avec une proportion de glycérol de **20%** en volume. Les colonies sont raclées et transférées dans le BHIB puis conservées à une température négative de **-20° C**. (**Boughachiche et al., 2012**).

### **II.2.6. Revivification des souches**

Pour revivifier les souches selon nos besoins, une suspension bactérienne de **0,1 ml** est ensemencée en surface sur une boîte de Pétri contenant le milieu GNO. Les boîtes sont ensuite incubées à **30 °C** pendant **24 heures**.

### **II.2.7. Recherche des activités antibactériennes et antifongiques**

Deux méthodes sont employées pour le criblage des éventuelles activités antibactériennes et antifongiques, à savoir :

- **La méthode des disques de diffusion sur agar.**
- **La méthode de diffusion de puits d'agar.**

Les souches isolées ont été évaluées pour leur activité antibactérienne et / ou antifongique contre les bactéries BMR tests : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* et les souches fongiques tests : *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231.

#### **II.2.7.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques des BMR**

Les tests de susceptibilité aux antibiotiques sont employés dans le but de confirmer le profil de résistance des BMR provenant de l'établissement hospitalier.

##### **🚩 AntibioGramme par diffusion des disques**

L'antibiogramme offre la possibilité d'élucider la sensibilité d'une bactérie à l'égard des antibiotiques. La confirmation de la sensibilité des trois souches de bactéries multirésistantes envers diverses familles d'antibiotiques est réalisée par le biais de la méthode standard d'antibiogramme, à savoir la diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH), en conformité avec la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale, en sa **8<sup>ème</sup>** édition pour l'année **2020**.

### **II.2.7.2. Préparation des inocula des souches**

#### **a. Préparation des inocula de souches bactériennes tests (BMR)**

Un inoculum est préparé à partir d'une culture bactérienne de **24 heures** des bactéries tests *P. fluorescens*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae*. La densité cellulaire de l'inoculum est ajustée en diluant dans de l'eau physiologique stérile quelques colonies et en ajustant la turbidité à **0,5 McFarland**.

#### **b. Préparation des inocula de souches fongiques tests**

Il est procédé à la confection de suspensions fongiques à partir de cultures préalables vieilles de **3 à 5 jours**. Ces suspensions des souches sont ensuiteensemencées sur des milieux solides (Sabouraud) par écouvillonnage.

#### **c. Préparation des inocula des souches isolées**

Dans les deux méthodes susmentionnées, les souches bactériennes sont initiées à la culture pendant **18 heures** à une température de **30°C** sur la gélose (MH). À partir de ces cultures juvéniles, des suspensions bactériennes sont élaborées dans du sérum physiologique stérile (NaCl **0,9 %**). La turbidité des suspensions est fixée à (**0,5 McFarland**). À partir de ces suspensions, les souches bactériennes sont étalées par écouvillonnage sur des milieux MH dans des boîtes de Pétri. (Rahal, 2005).

### **II.2.7.3. Technique des disques de diffusion sur agar**

**Principe** : le principe repose sur la diffusion active du composé antibactérien à partir d'un disque préalablement imprégné, placé sur une surface d'agar contenant les micro-organismes cibles.

**Mode opératoire** : des disques de papier Whatman, mesurant 9 millimètres de diamètre, imprégnés de 30 microlitres de la suspension à tester, ont été desséchés et déposés sur la surface des boîtes contenant du (MH) pour l'activité antibactérienne et du (MS) pour l'activité antifongique, préalablement inoculés avec les souches bactériennes à tester (BMR) et les souches fongiques tests. Les boîtes ont ensuite été incubées à **4°C** pendant **2 heures**, permettant ainsi aux métabolites de se diffuser, puis incubées à **37°C** pendant **18 à 24 heures** pour les BMR et pendant **3 à 5 jours** pour les champignons tests (Yamaç et Bilgili, 2006; Hazalin *et coll*, 2009). Il est à noter que deux répétitions ont été effectuées pour chaque BMR et chaque champignon ATCC.

**Lecture des résultats** : après incubation, les boîtes de Pétri font l'objet d'une observation attentive, durant laquelle les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont méticuleusement mesurés au moyen d'un pied à coulisse. Il est à noter que le diamètre de la zone d'inhibition est étroitement lié à la sensibilité de la bactérie soumise aux tests.

#### **II.2.7.4. Technique de diffusion de puits d'agar**

**Principe** : tout comme la méthode des disques sur agar, la méthode des puits a pour finalité de mesurer l'inhibition de la propagation de micro-organismes examinés lors du contact avec des échantillons distincts d'agents antimicrobiens étudiés.

**Mode opératoire** : le milieu gélosé (MH) pour l'activité antibactérienne et (MS) pour l'activité antifongique, chaque boîte de Pétri reçoit 20 ml de milieu gélosé spécifique. Une fois les milieux solidifiés, toute la surface du milieu MH/MS estensemencée avec des BMR (pour l'activité antibactérienne) et des champignons ATCC (pour l'activité antifongique) à l'aide d'un écouvillon stérile. Des puits d'environ **6 mm** de diamètre sont creusés à l'aide d'une pipette Pasteur retournée et flambée à l'extrémité large. Dans ces puits, **60 µl** de chaque échantillon à tester sont déposés. Des puits contenant uniquement de l'eau distillée stérile sont également réalisés pour servir de témoins négatifs.

**Lecture des résultats** : la lecture est effectuée après une incubation de **24 heures** à une température de **37°C** pour les BMR, et après une période de **3 à 5 jours** à une température également de **37°C** pour les champignons ATCC. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse en millimètres (mm), en prenant en compte le diamètre du puits qui est de 6mm. (**Berghe et Vlietinck, 1991**).

#### **II.2.8. Identification microbiologique classique des souches bactériennes isolées**

Cette identification est une identification préliminaire englobant l'ensemble des souches isolées.

##### **II.2.8.1. Examen macroscopique**

Il s'agit d'une explication des caractères morphologiques des souches, une fois cultivées sur un milieu GNO. Nous caractérisons nos souches en fonction de la taille des

colonies, la forme, le relief, le contour, l'opacité, la couleur, la consistance et l'aspect de la surface des colonies.

## **II.2.8.2. Examen microscopique**

### **a. Coloration différentielle de Gram**

**Principe** : la coloration de Gram est une technique utilisée à des fins de caractérisation de la paroi bactérienne, dans le but de différencier les bactéries Gram-négatives des bactéries Gram-positives. Les bactéries Gram-négatives sont reconnues pour leur teneur élevée en lipides et leur faible teneur en peptidoglycane (20%). D'un autre côté, les bactéries Gram-positives sont reconnues pour leur faible teneur en lipides et leur teneur élevée en peptidoglycane (80%).

**Mode opératoire** : il faut tout d'abord préparer un frottis de la souche test. Ensuite, la lame est couverte de violet de gentiane pour une coloration primaire, laissant agir pendant une minute. Par la suite, le mordantage est effectué avec une solution de lugol pour fixer le colorant. Puis, la décoloration de l'échantillon est effectuée à l'aide d'alcool éthylique pendant 30 secondes, permettant de décolorer les bactéries à GRAM (-) riches en lipides. Une contre-coloration est effectuée avec la fuchsine pour différencier les deux groupes bactériens. Enfin La lame est rincée à l'eau distillée stérile, égouttée et séchée au-dessus du bec bunsen. Enfin, l'échantillon est observé à l'objectif (G x 100) avec une goutte d'huile à immersion (**Larpent et al., 1990**).

**Lecture des résultats** : les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose tandis que les bactéries à Gram positif apparaissent en violet

### **b. Tests biochimiques**

#### **Test catalase**

**Principe** : dans le cadre de leur respiration, certaines bactéries ont la capacité de générer du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), une substance hautement nocive pour les organismes vivants. Toutefois, il existe certaines bactéries qui possèdent la capacité de décomposer le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grâce à la catalase, une enzyme qui facilite la dégradation de cette substance dangereuse en eau et en oxygène, selon la réaction suivante :



**Mode opératoire** : il convient de déposer délicatement sur une lame de verre propre une colonie prélevée à partir d'une culture pure, puis de la soumettre à une solution

de peroxyde d'hydrogène en y incorporant une ou deux gouttes avec une grande minutie.

**Lecture des résultats** : Une réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O<sub>2</sub>) (Marchal et al., 1982). (Figure n°7, Annexe V).

#### **Teste oxydase**

**Principe** : le test d'oxydase est une méthode de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries. Le cytochrome oxydase est une protéine membranaire qui se situe dans la membrane interne des mitochondries chez les êtres vivants eucaryotes et dans la membrane cytoplasmique chez les procaryotes. La détection de cette enzyme est possible grâce à des disques en papier contenant une substance qui vire au bleu en présence de l'enzyme. Le test permet de différencier les bactéries oxydase-positives et oxydase-négatives. L'utilisation de boucles métalliques doit être évitée car elle peut causer des résultats faussement positifs.

**Mode opératoire** : mettre une colonie de l'isolat sur le disque oxydase imbibé d'eau physiologique dans une zone toujours stérile à proximité de bec bunsen.

**Lecture des résultats** : une réaction positive se traduit par une couleur bleue violacée se manifeste en quelques secondes (30 s) (Figure°8, Annexe V,) (Joffin et al., 2006).

### **II.2.8.3 Identification microbiologique des souches performantes**

Cette identification se restreint exclusivement aux souches ayant manifesté une activité antifongique.

#### **II.2.8.3.1 Identification des Bacilles à Gram négatifs non entérobactéries**

##### **Galerie Api 20NE**

**Principe** : la galerie API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non-entérobactéries et non fastidieux. Elle est composée de 20 micro-tubes qui contiennent des substrats déshydratés. Les tests classiques sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions générées pendant la période d'incubation se manifestent par des changements de couleur spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. (bioMérieux ,2009).

**Mode opératoire** : représenté dans Annexe X .

Lecture des résultats : représenté dans **Annexe X** .

### II.2.8.3.2. Identification des Cocci à Gram négatif

#### ✚ Galerie Api NH

**Principe** : la galerie **Api NH** est employée pour identifier les Cocci à Gram négatif tels que *Neisseria* et *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*), *Haemophilus* (de petits bacilles à Gram négatif). Elle est équipée de dix micro-tubes contenant des substrats déshydratés pour effectuer douze tests d'identification et détecter la pénicillinase. (bioMérieux ,2016)

**Mode opératoire** : représenté dans **Annexe X** .

Lecture des résultats : représenté dans **Annexe X** .

### II.2.8.3.3. Identification de *Bacillus spp.*

#### a. Test physiologique

##### ✚ Recherche du type respiratoire sur milieu VF

**Principe** : le milieu viande de foie (VF) octroie la capacité de caractériser le mode respiratoire d'une bactérie, en d'autres termes, délimiter son attitude envers le dioxygène. Certaines bactéries ne peuvent subsister qu'en son absence, d'autres seulement en sa présence, alors que d'autres encore sont indifférentes à sa présence.

**Mode opératoire** : pour réaliser cette méthode, nous commençons par une régénération prolongée, du milieu VF, de **20 minutes** à l'aide d'un bain d'eau bouillante pour éliminer les gaz dissous. Cela favorise la création d'un gradient partiel en oxygène. Ensuite, nous procédons à l'ensemencement en utilisant une pipette pasteur hermétique par pique centrale et en effectuant une remontée en spirale dans la gélose. Il est important que le tube soit en surfusion, c'est-à-dire à une température de **45°C**. Après la solidification de la gélose, nous plaçons le tout dans une étuve pendant **24 heures** à une température de **30°C**.

**Lecture des résultats** : après 24 heures d'incubation à 30°C, on observe à quel niveau du tube il y a eu culture. (Benaissa ,2021) (**Figure n°9, voir annexe V**).

✚ **Confirmation du genre des *Bacillus spp* par élimination des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR)**

**Principe** : la recherche des bactéries sulfito-réductrices est basé sur leur capacité à réduire le sulfite en sulfure d'hydrogène (**H<sub>2</sub>S**) dans un milieu à base de (**VF**), Cette réduction du sulfite est souvent utilisée comme critère pour identifier ces bactéries.

**Mode opératoire** : afin de réaliser cette méthode, il convient de prélever environ **20 ml** d'eau de la suspension bactérienne dans un tube stérile et de le chauffer à environ **80°C** pendant **8 à 10 minutes** afin de détruire toutes les formes végétatives des ASR qui pourraient être présentes. Après le chauffage, ont refroidi immédiatement le tube sous l'eau du robinet pour créer un choc thermique. Par la suite, il est nécessaire de répartir le contenu de ce tube dans 4 tubes stériles, à raison de 5 ml par tube. Après cela, on ajoute **20 ml** de gélose (VF) en surfusion, à laquelle on a ajouté une ampoule d'Alun de Fer et une ampoule de Sulfite de sodium. On mélange ensuite doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air et l'introduction d'oxygène. Enfin, on laisse le milieu se solidifier sur une paillasse pendant **30 minutes** avant de l'incuber à **30°C** pendant **18 à 24 heures**. La lecture des résultats doit se faire à **16h, 24h** puis **48h**.

**Lecture des résultats** : après l'incubation, les résultats sont observés et interprétés. La présence de colonies noires entourées d'un halo noir indique une réduction réussie du sulfite en sulfure d'hydrogène par les bactéries sulfito-réductrices. (**Rodier et al.,2009**)

# **III. Résultats et discussion**

### III.1. Résultats et discussion

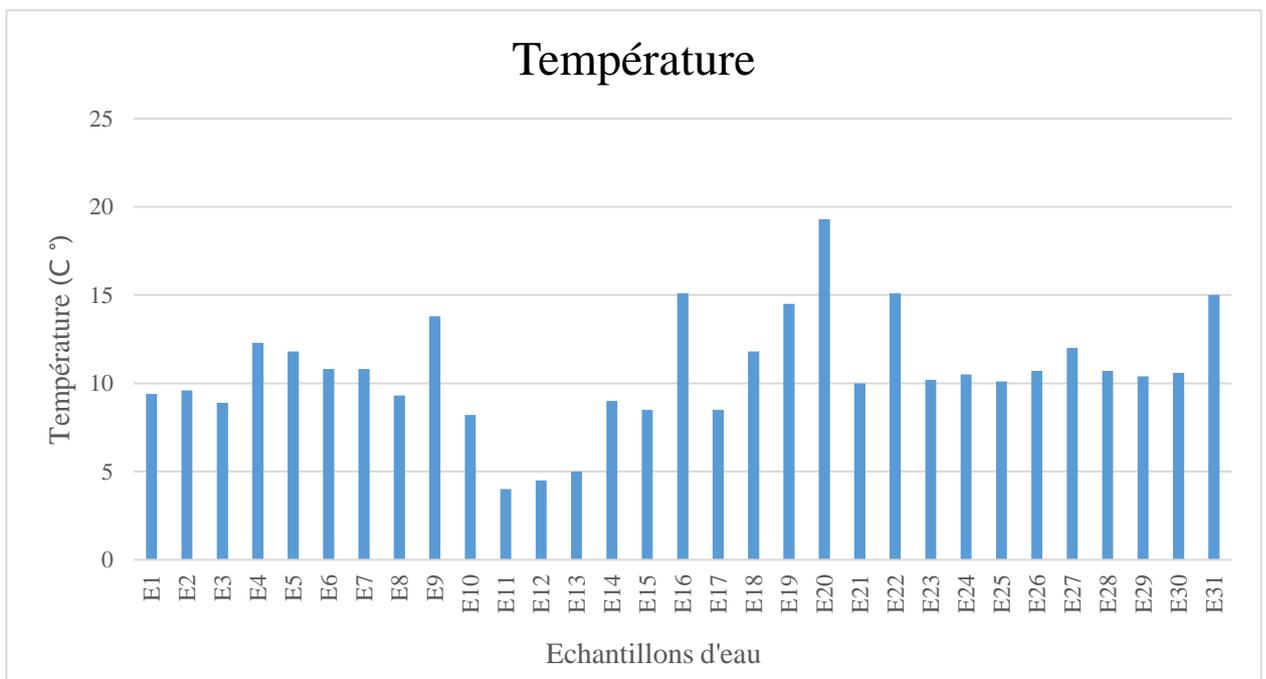
#### III.1.1 Résultats des analyses physico-chimiques

##### III.1.1.1 Paramètres physiques

###### a. Température

La température des échantillons d'eau prélevés varie entre **4 °C** et **20 °C** en fonction des conditions météorologiques au moment du prélèvement.

Les résultats de la mesure de la température sont résumés dans le tableau **V (Annexe VI)** et représentés dans la figure ci-dessous :



**Figure n°10** : Résultats des mesures de température *in situ*.

###### b. PH

Tous les échantillons d'eau étudiés ont des pH inclus dans l'intervalle [**6 ≤ pH < 8**]. Les résultats des mesures de pH sont résumés dans le tableau **V (Annexe VI)** et représentés dans la figure ci-dessous :

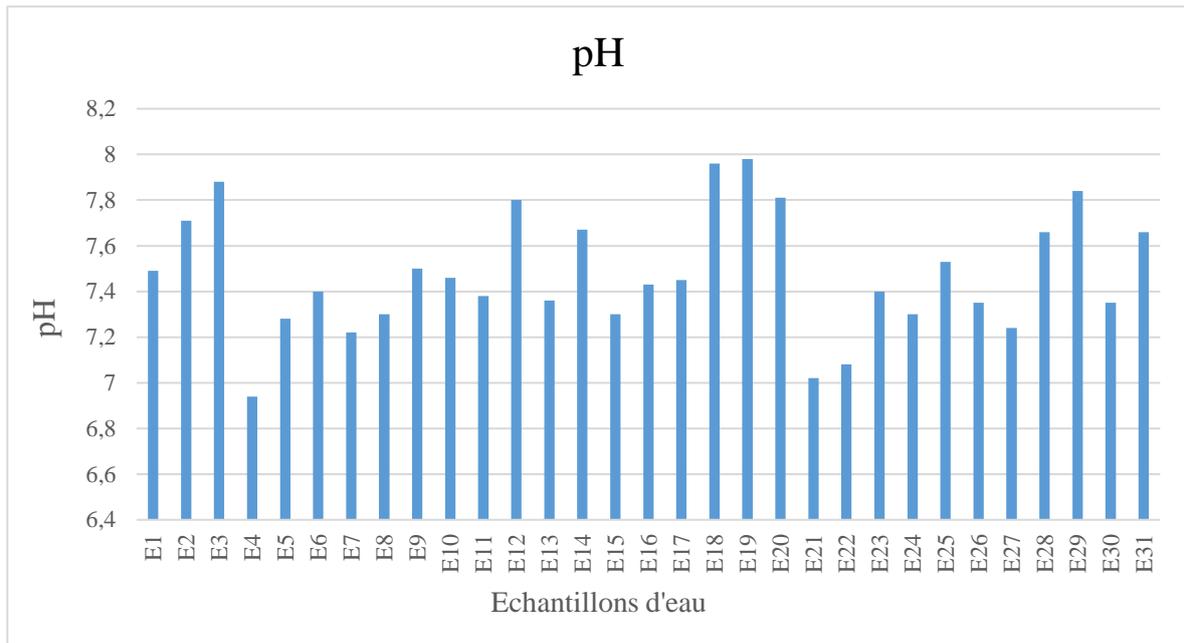


Figure n°11 : Résultats des mesures de pH.

### III.1.1.2. Paramètre chimique

#### a. Dosage du Chlore

La mesure des taux du chlore libre dans les échantillons d'eaux a été réalisée par un analyseur de chlore à l'aide de comprimé DPD. Tous les échantillons d'eau qui ont été prélevés sont chlore négatif. Les résultats des mesures du chlore sont résumés dans le tableau V. (Annexe VI).

### III.1.2. Résultats d'isolement et de purification des souches bactériennes

Nous avons collecté 50 souches bactériennes à partir de 31 échantillons prélevés après leur isolement par la méthode de filtration sur membrane et leur purification par repiquages successifs sur milieu CCA. (Figure n°12, Annexe VII).

### III.1.3. Résultats du criblage des activités antibactériennes et antifongiques

#### III.1.3.1. Confirmation du profil de résistance des BMR

Au cours de cette étude l'antibiogramme réalisé a été effectué seulement pour la confirmation de la sensibilité et de la résistance des bactéries tests (BMR) vis-à-vis de divers

antibiotiques selon la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 8<sup>ème</sup> Edition 2020.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été comparés aux diamètres critiques conformément aux normes de standardisation. (Tableau VI).

**Tableau VI** : Profil de résistance des bactéries tests.

		<i>Acinetobacter baumannii</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Famille d'antibiotique	Antibiotique		Diamètre d'inhibition		Diamètre d'inhibition		Diamètre d'inhibition
<b>B-Lactamines</b>	<b>AMC (30)</b>	<b>R</b>	6mm	S	20mm	<b>R</b>	6mm
	<b>CZ (30)</b>	-	-	<b>R</b>	8mm	-	-
	<b>CN (10)</b>	-	12mm	-	10mm	-	17mm
	<b>CX (30)</b>	<b>R</b>	6mm	<b>R</b>	8mm	<b>R</b>	6mm
	<b>CL (30)</b>	<b>R</b>	6mm	<b>R</b>	6mm	<b>R</b>	6mm
	<b>CTR (30)</b>	-	-	<b>R</b>	6mm	-	-
	<b>IPM (10)</b>	<b>R</b>	9mm	<b>R</b>	10mm	S	24mm
<b>Quinolones</b>	<b>CIP (10)</b>	<b>R</b>	6mm	<b>R</b>	6mm	S	32mm
	<b>PI (100)</b>	<b>R</b>	6mm	-	-	<b>R</b>	13mm
<b>Aminosides</b>	<b>AK (30)</b>	I	16mm	S	20mm	S	20mm
<b>Phénicolés</b>	<b>C (30)</b>	<b>R</b>	6mm	S	18mm	<b>R</b>	6mm
<b>Sulfamides</b>	<b>SXT (25)</b>	-	-	<b>R</b>	6mm	-	-

Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques ont révélé que les souches d'*Acinetobacter baumannii*, de *Klebsiella pneumoniae* et de *Pseudomonas aeruginosa* présentaient au moins une résistance vis-à-vis de trois familles d'antibiotiques (**Figure n°22, annexe VIII**) et sont de ce fait, multirésistantes par définition.

### III.1.3.2. Activité antibactérienne

Les Tableaux VII et VIII (**Annexe VIII**) résument les résultats du criblage des éventuelles activités antibactériennes de notre collection de souches à l'égard des BMR tests à savoir *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*.

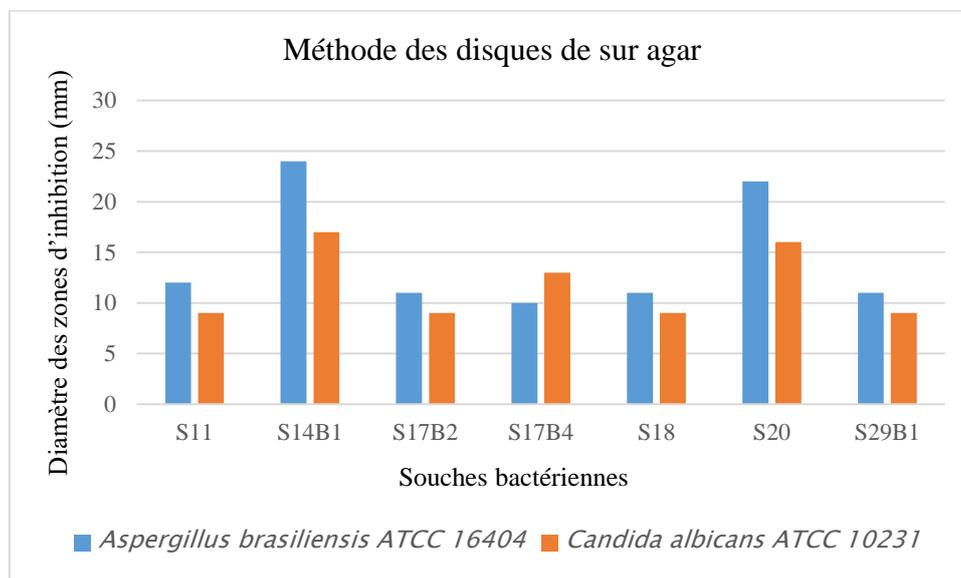
Nos résultats montrent qu'aucune des 50 souches isolées n'a présenté un effet inhibiteur vis-à-vis des BMR tests et ce quelle que soit la méthode utilisée.

### III.1.3.3. Activité antifongique

#### III.1.3.3.1. Résultats d'inhibition par la technique des disques de diffusion sur agar

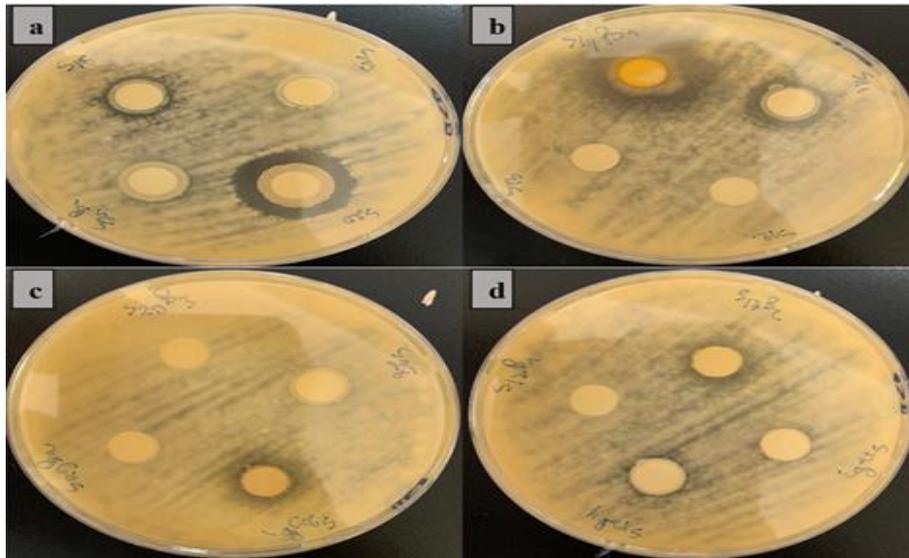
La technique des disques de diffusion sur agar a été utilisée pour rechercher des éventuelles activités antifongiques, chez la collection des 50 souches isolées.

Les résultats sont regroupés dans le Tableau VII (annexe IX) est Représentés dans l'histogramme suivant (figure n°13).



**Figure n°13 :** Activités antifongiques par la technique des disques de diffusion sur agar.

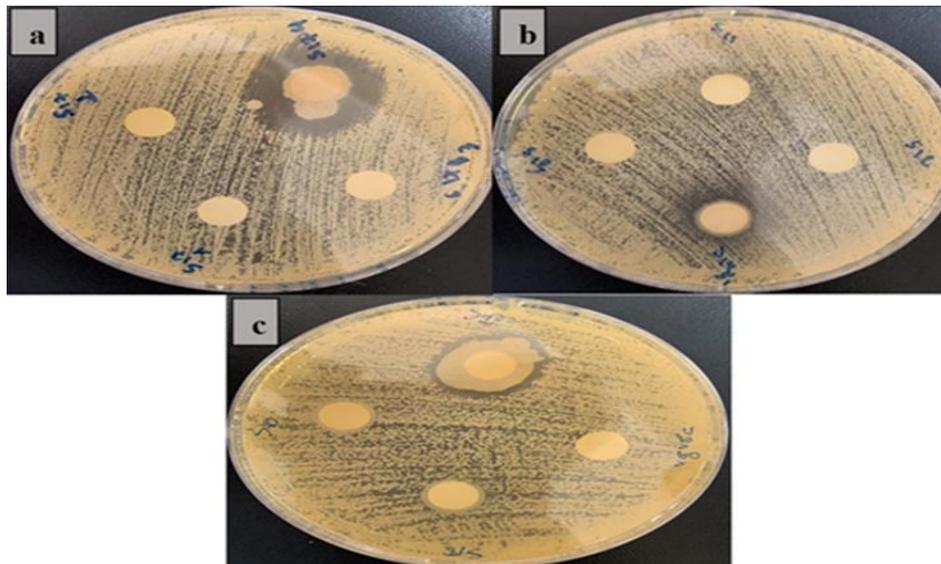
Parmi les souches testées, Nous avons observé que 7 des 50 souches, (soit 14%) de notre collection de souches bactérienne ont marqué des activités contre *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404 avec des zones d'inhibition allant de **10 à 24 mm**. Les deux isolats les plus performants, **S14B1** et **S20**, ont généré des zones d'inhibition maximales mesurant **24 mm** et **22 mm** de diamètre respectivement. Les isolats **S11**, **S18** et **S29B1** ont quant à eux démontré une activité modeste, avec des diamètres d'inhibition compris entre **11 mm** et **12 mm**, soit la moitié de ceux observés chez les souches les plus performantes. Enfin, l'isolat S17B4 est la souche chez laquelle nous avons révélé la plus petite zone d'inhibition, mesurant **10 mm** de diamètre. (Figure n°14).



**Figure n°14 :** Activités antifongiques contre *A.brasiliensis* réalisée par la méthode des disques (Photo originale).

a ) inhibition de *A. brasiliensis* par S18 et S20 ; b) inhibition de *A.brasiliensis* par S11 et S14B1 ; c) inhibition de *A.brasiliensis* par S29B1 ; d) inhibition de *A.brasiliensis* par S17B2 et S17B4.

D'autre part, seulement **3** sur 50 souches testées ont présenté une activité antifongique contre *Candida albicans* ATCC10231, soit un pourcentage de **6%**. Les isolats **S14B1** et **S20** ont montré les plus grandes zones d'inhibition, avec des diamètres de **16** et **17 mm** respectivement suivis par l'isolat **S17B4** qui a montré une zone d'inhibition, mesurant seulement 13 mm. (**Figure n°15**).

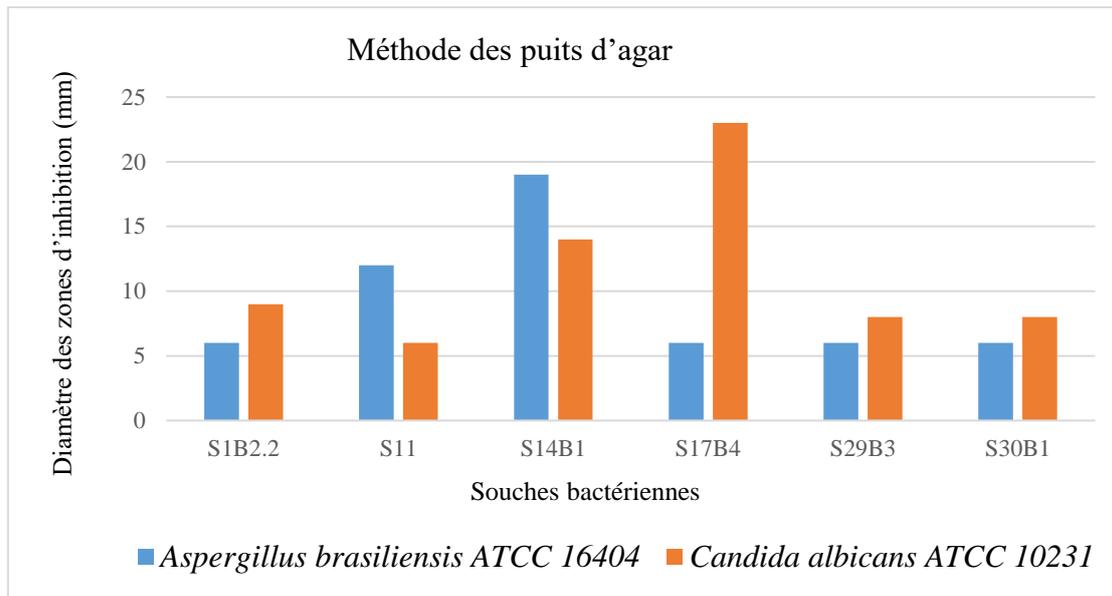


**Figure n°15 :** Activités antifongiques contre *C. albicans* réalisée par la méthode des disques (photo originale).

a) inhibition de *C.albicans* par S17B4 ; b) inhibition de *C.albicans* par S14B1 ; c) inhibition de *C.albicans* par S20

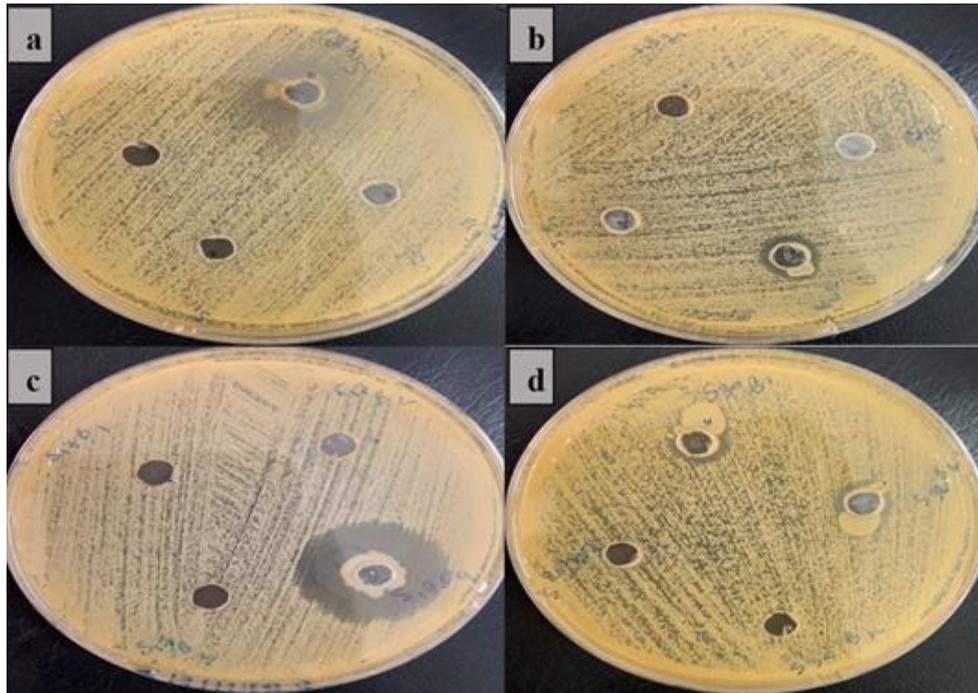
**b) III.1.3.3.2. Résultats d'inhibition par la technique de diffusion des puits d'agar**

Une deuxième technique de diffusion des puits sur agar a été effectuée dans cette présente étude pour évaluer l'activité antifongique. Cette technique permet la mise en contact de la suspension bactérienne des isolats avec les champignons tests. L'activité inhibitrice se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les résultats sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (**figure n°16**) et le Tableau VIII (**Annexe IX**).



**Figure n°16 :** Résultats de la technique de diffusion des puits d'agar.

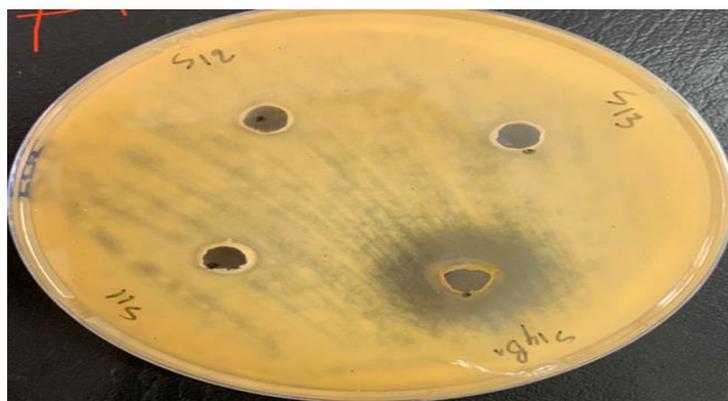
Concernant cette technique, seulement **5** des 50 souches isolées (soit **10%**) des souches ont présenté des activités antifongiques contre *C. albicans* ATCC10231, dont les zones d'inhibitions allaient de **8** à **23mm**. S17B4 s'est avéré être l'isolat le plus performant en démontrant une zone d'inhibition remarquable de **23 mm**. Les isolats S14B1 et S1B2.2 ont fait preuve d'une activité antifongique modeste, avec des diamètres de zone d'inhibition mesurant respectivement **14 mm** et **9 mm**. Quant aux deux isolats, **S29B3** et **S30B1**, ils ont présenté la plus petite zone d'inhibition avec un diamètre de **8 mm**. (**Figure n°17**).



**Figure n°17 :** Les souches ayant une activité antifongique contre *C. albicans* par la méthode de puits (Photo originale).

a) S14B1; b) S1B2-1; c) S17B4; d) S29B1 et S30B1.

Toutefois, en ce qui concerne *Aspergillus brasiliensis* ; seulement **4%** des souches testées ont présenté une activité antifongique, soit seulement 2 sur 50 souches. L'isolat **S14B1** a montré la plus grande zone d'inhibition, atteignant un diamètre de **19 mm**, tandis que l'isolat **S11** a montré une activité antifongique minimale avec un diamètre d'inhibition de **7 mm** (Figure n°18).



**Figure n°18 :** Inhibition de *A. brasiliensis* ATCC16404 par S14B1 et S11 par la méthode de puits (Photo originale).

### **III.1.4. Résultats de l'identification microbiologique classique des souches bactériennes isolées**

#### **III.1.4.1. Résultats de l'examen macroscopique**

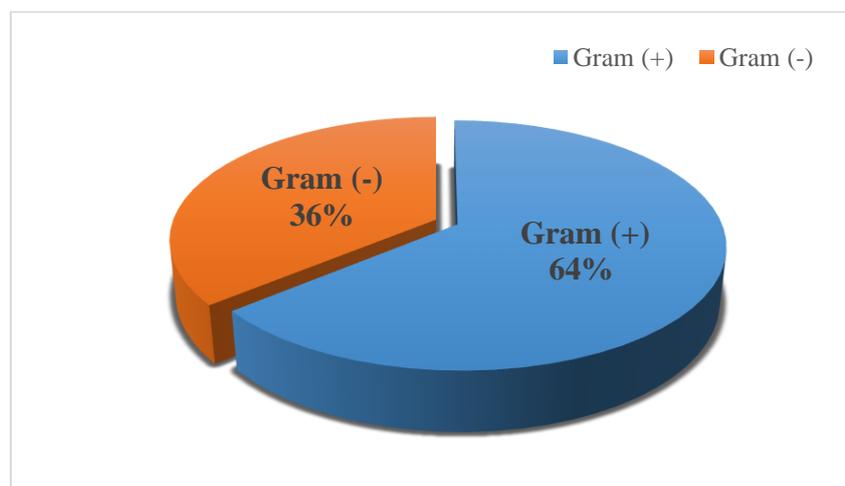
Les résultats de l'examen macroscopique portant sur la taille, la forme, le contour, le relief, l'opacité, la couleur, la consistance et l'aspect de la surface des colonies sont résumés dans le Tableau **IX** (**Annexe IX**).

Les colonies observées dans cette étude présentent généralement une forme variable, allant de ronde régulière à irrégulière. Leur couleur varie du blanc au beige, parmi les souches observées, trois présentaient une coloration jaunâtre, tandis qu'une seule souche avait une coloration verte. Le diamètre approximatif des colonies varie de 1 à 5 mm. La plupart des souches démontrent une consistance allant de crémeuse à sèche, avec des colonies ayant un aspect translucide et brillant, tandis que des colonies sèches et opaques ont également été observées.

#### **III.1.4.2. Résultats de l'examen microscopique**

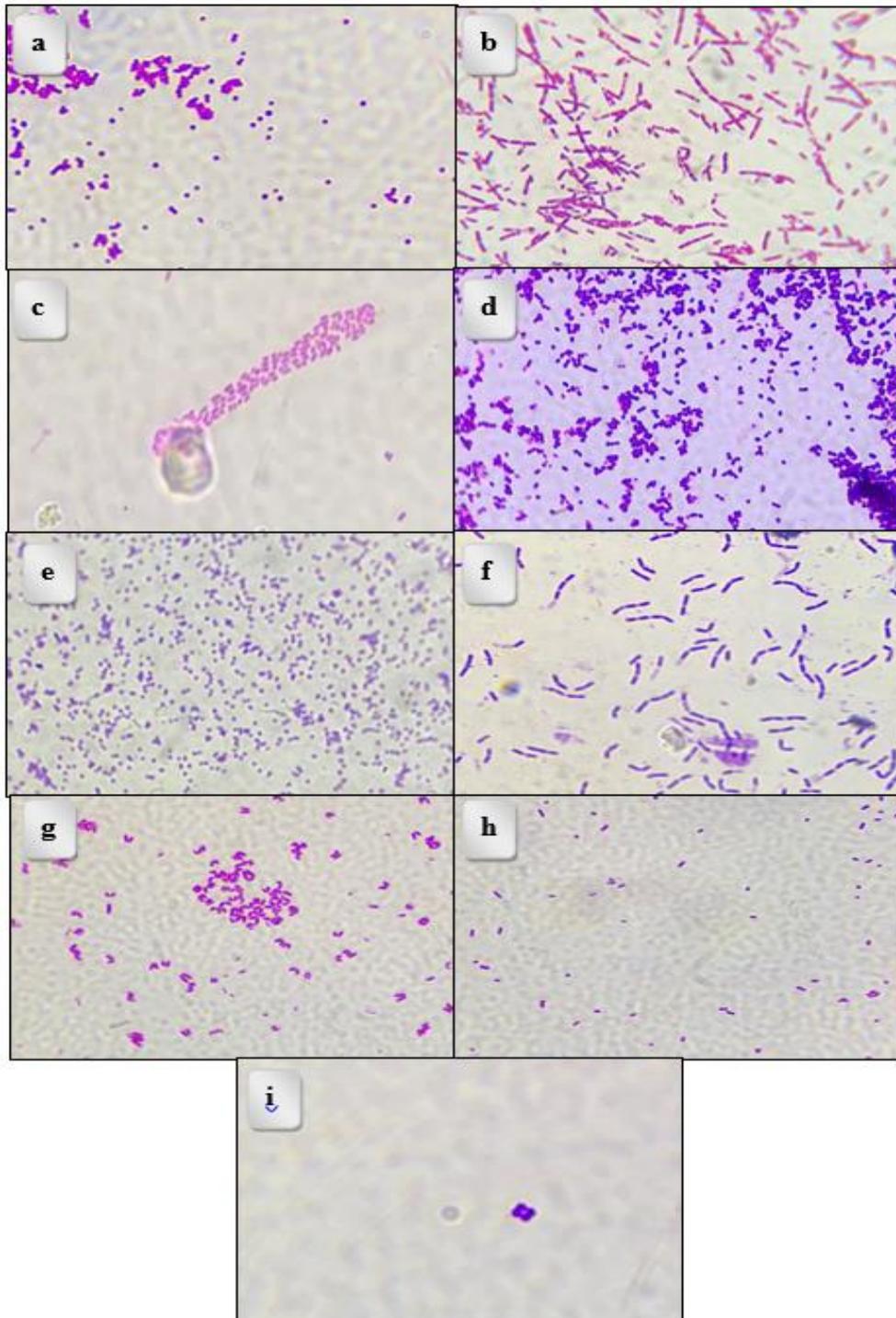
##### **III.1.4.2.1. Résultats de la coloration de Gram**

Les résultats de la coloration indiquent que **64%** (n= 32) du total des isolats sont des bactéries à Gram positif, alors que **36%** (n=18) sont des bactéries à Gram négatif tel est représenté dans la figure n 13 ci-dessous. (Les résultats détaillés se trouve au niveau de l'annexe. (Tableau **X**, **annexe IX**).



**Figure n°19** : Résultats de la coloration différentielle de Gram.

La figure n° 20, représente les différents aspects microscopiques de quelques souches après coloration de Gram :



**Figure n°20 :** Résultats de la coloration de Gram (Photo originale).

a) bacilles à Gram négatif, b) Cocci à Gram négatif, c) coccobacilles à Gram négatif, d) diplocoques à Gram négatif, e) bacilles à Gram positif, f) Cocci à Gram positif, g) diplocoques à Gram positif, h) tétra-coques à Gram positif, i) coccobacilles à Gram positif.

#### **III.1.4.2.2. Résultats des tests biochimiques**

##### **b. Résultats des tests oxydase et catalase**

Les résultats des tests catalase et des tests oxydase des isolats bactériens sont résumés dans Tableau **XI (Annexe IX)**. Toutes les souches bactériennes étudiées possèdent au moins l'une des deux enzymes respiratoires recherchées. **50** souches sont catalase positive.

Nos résultats montrent que **14** souches sont oxydase positive, alors que **04** souches sont oxydase négative.

#### **III.1.4.3. Résultats de l'identification microbiologique des souches performantes**

Dans cette étude, nous avons identifié uniquement les souches ayant une activité antifongique contre *C. albicans* ATCC 10321 et *A. brasiliensis* ATCC16404.

Les **bacilles Gram négatif** non entérobactéries ont été identifiées à l'aide de la galerie miniaturisées Api **20NE**. Les résultats sont consignés dans le tableau **XII**. Tandis que, les **cocci Gram négatif** ont été identifiées à l'aide de la galerie miniaturisée **Api NH**. Les résultats sont représentés dans le tableau **XIII**

##### **III.1.4.3.1. Résultats de l'identification des bacilles à Gram négatif non-entérobactéries**

###### **a. Résultats de la galerie Api 20NE**

Les résultats des galeries miniaturisées Api 20NE utilisées pour l'identification biochimique des bacilles Gram négatif non-entérobactéries sont représentés dans le Tableau **XII** ci-après :

Tableau XII : Résultats de la galerie Api 20NE.

	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MIL	CIT	PAC
S11	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevundimonas vesicularis</i>																				
S14B1	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>																				
S18	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevundimonas vesicularis</i>																				
S29B1	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>																				

III.1.4.3.2. Résultats de l'identification des Cocci à gram négatifs

a. Résultats de la galerie Api NH

Les résultats d'identification des cocci Gram négatif par la galerie Api NH sont représentés dans le tableau XIII suivant :

Tableau XIII : Résultats de la galerie Api NH.

	PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	BGAL	ProA	GGT	IND
													
S30B1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>													

III.1.4.3.3. Identification du genre *Bacillus* spp.

a. Résultats de l'identification des *Bacillus* par l'élimination des bactéries ASR

L'absence de toute colonie noire sur le tube contenant le milieu VF indique qu'il n'y a pas de spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices présentes. Cette observation suggère qu'il n'y a pas de croissance ou de développement de ces bactéries dans le milieu utilisé.

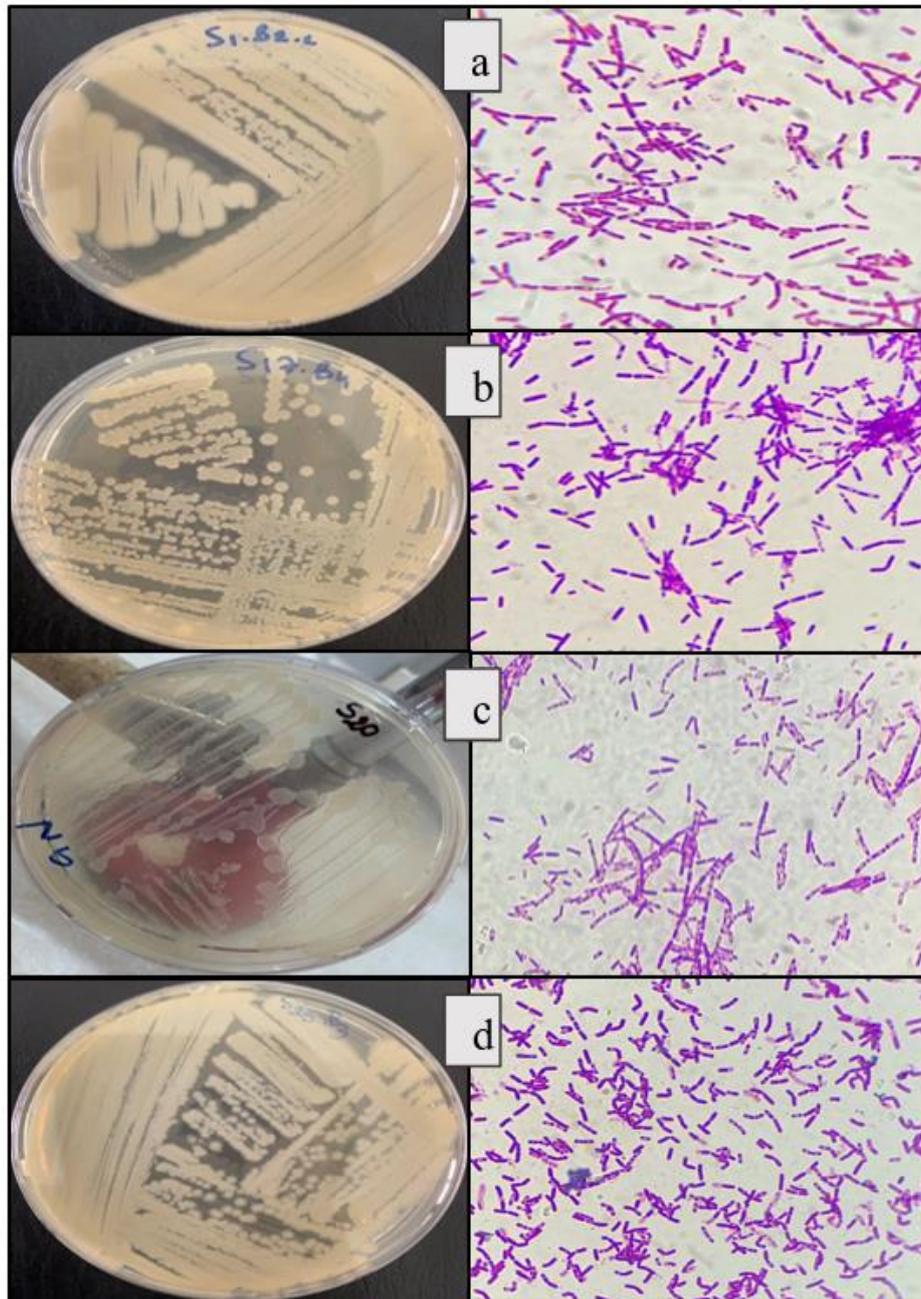
b. Résultats de la recherche du type respiratoire

Les résultats de la recherche du type respiratoire des souches isolées révèlent que les souches S1B2-2, S17B2, S17B4 et S20 sont des souches aérobies stricts, tandis que la souche S29B3 est une souche aéro-anaérobie facultatif. (Tableau XIV, Annexe XI).

c. Mise en évidence de la présence de spore

Lors de la coloration de Gram, les souches S1B2-2, S17B2, S17B4 et S20 ont révélé la présence de spores, qui se sont manifestées sous forme de structures incolores bien délimitées

à l'intérieur des bacilles. Cette observation est attribuée à la présence d'enveloppes sporulés qui empêchent la pénétration des colorants.



**Figure n°21 :** Résultats de la présence des spores chez les 4 souches de *Bacillus spp.* (Photo originale). a) S1B2-2; b) S17B4; c) S20; d) S29B3

### **III.2. Discussion**

Contrairement à nos résultats, **Olishevsk**a et ses collaborateurs (**2013**) ont entrepris l'isolement de souches à partir de 123 échantillons environnementaux, comprenant des sols, des eaux, des feuilles et des fruits de plantes prélevés dans différentes régions du Québec. Ils ont ensuite recherché l'activité antimicrobienne de ces souches isolées vis-à-vis de souches cliniques résistantes aux antibiotiques, à savoir *S. aureus* ED711 et *P. aeruginosa* ED416A, en utilisant la technique de diffusion sur gélose. Leur criblage a révélé la présence de plusieurs souches bactériennes et fongiques productrices d'exo-métabolites secondaires ayant une activité antibactérienne contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Par ailleurs ; **El Amraoui** et ses collègues (**2014**) ont testé 34 microorganismes marins en utilisant la méthode de diffusion en gélose contre trois bactéries à Gram positif et deux bactéries à Gram négatif. Les résultats de cette recherche indiquent que 21 souches, soit 62% des micro-organismes testés, ont montré une activité contre les bactéries à Gram négatif. Parmi les isolats ayant une activité antimicrobienne, 14 ont été identifiés et attribués aux genres *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Enterococcus*, *Pantoea* et *Pseudomonas*. Ces découvertes préliminaires suggèrent que les micro-organismes marins possèdent un potentiel antibactérien bien plus intéressant que les microorganismes telluriques.

Dans l'étude menée par **Kacem** et **Youcef-Ali** (**2017**)., trois isolats bactériens du genre *Bacillus* et un isolat fongique provenant de différents sites de la zone aride de l'Est Algérien ont été sélectionnés en fonction de leur activité *in vitro* contre *Candida albicans*, en utilisant la méthode de diffusion sur gélose avec des disques de **5 mm** des colonies bactériennes. Les zones d'inhibition observées variaient entre **25 mm** et **15 mm**. Cependant, dans notre propre essai, nous avons utilisé des isolats d'origine aquatique pour évaluer leur activité contre *Candida albicans* en utilisant la méthode de diffusion sur gélose avec des disques de **9 mm** imprégnés de la suspension à tester. Dans notre cas, trois isolats ont également présenté une activité antifongique contre *Candida albicans*, dont deux appartiennent au genre *Bacillus* (S20, S17B4), avec des zones d'inhibition mesurant respectivement **17 mm** et **13 mm**. Ainsi, bien que les méthodes utilisées diffèrent entre les deux études, mais nous avons observé des résultats similaires en termes de genre des isolats présentant une activité anti-*candida* et des diamètres d'inhibition proches de ceux de l'étude de **Kacem** et **Youcef-Ali**.

Dans une étude menée par **Wang** et ses collaborateurs en **2022**, il a été observé que la souche *Bacillus spp* présente une activité antifongique contre *Candida albicans*. De plus,

d'autres genres bactériens tels que *Pseudomonas spp* et *Streptomyces spp* ont également montré une activité contre *Trichoderma spp.* et *Saccharomyces spp.* Il convient de noter que *Bacillus spp* est largement utilisé pour son action antifongique, notamment contre *Candida albicans*, en raison de sa bonne biosécurité et de sa résistance élevée.

Nous avons pris en considération les résultats obtenus par nos collègues biochimistes (**Adouane et Kichah, 2023**) (qui ont partagé avec nous la première étape de notre étude à savoir l'isolement et la collection de souches bactériennes) concernant l'activité enzymatique des souche **S17B2, S17B4, S20, S29B3**. Leur travail a permis de mettre en évidence la capacité de ces souches à synthétiser plusieurs enzymes en l'occurrence **une kératinase, une amylase, une pectinase, une xylanase, une gélatinase et une lipase**. Ces résultats montrent que ces souches présentes une diversité enzymatiques et une richesse génétique intéressante.

Selon des études antérieures (**Gácsér et al., 2007**), il a été suggéré que la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, telles que des protéinases ou des lipases, peut avoir un impact sur la virulence de *Candida albicans*. Ces observations suggèrent que les souches étudiées pourraient présenter un potentiel antifongique significatif.

**El Amraoui** et ses collègues (**2014**) ont mené une étude visant à tester l'activité antifongicide de 34 microorganismes marins à l'aide de la méthode de diffusion en gélose à partir de puits contre quatre espèces de levures, qui sont connues pour être associées à différents hôtes marins. Les résultats ont montré que 11 isolats ont des activités antifongiques vis-à-vis de *C. albicans* CIP 48.72. Tandis que, 12 isolats ont des activités contre *C. albicans* CIP 884.65. Parmi ces isolats, ils ont identifié les bactéries suivantes : *A. baumannii*, *A. hydrophila*, *A. faecalis* et *C. violaceum*. Ces bactéries ont démontré une activité fongicide significative, grâce à leur capacité à produire un antifongique à large spectre

Les souches de *Bacillus spp.* étudiées présentent une capacité à former des endospores, un trait caractéristique qui a été déterminant dans la classification du groupe *Bacillus* depuis les années **1920**, tel que mentionné dans toutes les éditions du Manuel de Systématique de **Bergey**. La formation d'endospores dans des conditions aérobies est considérée comme un élément clé pour identifier les espèces appartenant à ce genre bactérien.

Le genre *Bacillus spp.* est largement répandu dans une variété de niches écologiques, couvrant des environnements allant du sol aux milieux aquatiques. Cette diversité a été confirmée par plusieurs études, où des souches de *Bacillus* ont été isolées à partir d'eaux de

mer, de sédiments, de lacs salés, de poussières, de sources d'eau chaudes et de sols pollués (Mutzel *et al.*, 1996; Danne *et al.*, 2002; Yumoto *et al.*, 2003).

Après identification, les souches bactériennes **S14B1** (*P. fluorescens*), **S17B4** et **S20** (*Bacillus spp.*) ont montré une activité inhibitrice contre *C. albicans ATCC10231* par la méthode des disques. De plus, ces mêmes souches ont également montré une activité inhibitrice lors de l'évaluation en utilisant la méthode des puits. Trois autres souches, **S1B2-2** et **S29B3** (*Bacillus spp.*), **S30B1** (*Neisseria gonorrhoeae*), ont également montré une activité inhibitrice lors de l'évaluation en utilisant la méthode des puits.

Les souches **S11** et **S18** (*Brevundimonas vesicularis*), **S14B1** (*P. fluorescens*), **S17B2**, **S17B4**, et **S20** (*Bacillus spp.*) et **S29B1** (*Aeromonas hydrophila*) ont montré une activité antifongique contre *A. brasiliensis ATCC 16404* en utilisant la méthode des disques. De plus, lors de l'évaluation en utilisant la méthode des puits, deux souches **S11** (*Brevundimonas vesicularis*) et **S14B1** (*P. fluorescens*) ont également montré une activité inhibitrice.

Selon Flury *et al.* (2016), plusieurs études ont montré que *Pseudomonas fluorescens* possède la capacité d'inhiber in vitro un large éventail de champignons phytopathogènes. Cependant, il convient de noter que *P. fluorescens* présente également divers traits fonctionnels qui lui permettent de croître et de prospérer, notamment la production de métabolites secondaires bioactifs (Scales *et al.*, 2014). Certains membres de *P. fluorescens* ont montré un potentiel en tant qu'agents de lutte biologique, supprimant les maladies des plantes en protégeant les graines et les racines contre les infections fongiques. Ils sont reconnus pour réduire la gravité de nombreuses maladies fongiques. (Girija Ganeshan et Manoj Kumar ,2005)

A notre connaissance nous supposons qu'ont fait partie des premières à évaluer l'activité de cet isolat de *P. fluorescens* contre des champignons pathogènes de l'homme tels que *Candida albicans ATCC 10231* et *Aspergillus brasiliensis ATCC 16404*. Les résultats obtenus par les deux méthodes utilisées ont montré des résultats satisfaisants, indiquant une activité inhibitrice prometteuse de cet isolat contre ces pathogènes fongiques. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité de cet isolat dans des contextes cliniques spécifique.

## **IV. Conclusion**

---

## Conclusion

La recherche de nouvelles molécules antibactériennes et / ou antifongiques est un domaine d'étude en constante évolution, mené par de nombreux laboratoires, dans le but de lutter contre les infections graves causées par les bactéries et les champignons.

Dans le cadre de la présente étude, nous avons évalué la capacité de certaines souches bactériennes isolées d'un biotope qu'on explore pour la première fois, à synthétiser des molécules bioactives. Ces molécules offrent un potentiel en tant que source naturelle de biomolécules.

Notre étude s'est penchée sur l'activité antibactérienne et antifongique de 50 souches isolées à partir d'eaux naturelles à l'égard de trois souches multirésistantes (BMR) : *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*, ainsi que deux champignons de référence : *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Bien que l'activité antibactérienne contre les germes tests n'ait pas été observée dans les deux méthodes d'évaluation utilisées.

Dans le cadre de l'activité antifongique évaluée par la méthode des disques, nous avons observé que 7 souches (**S11 ; S14B1 ; S17B2 ; S17B4 ; S18 ; S20 ; S29B1**) soit 14% ont montré une activité contre *Aspergillus brasiliensis*. En revanche, 3 souches (**S14B1 ; S17B4 ; S20**) soit 6% ont montré une activité antifongique contre *Candida albicans*.

En ce qui concerne la méthode des puits, nous avons noté que 5 souches (**S1B2.1 ; S14B1 ; S17B4 ; S29B3 ; S30B1**) soit 10% ont présenté une activité contre *Candida albicans*, tandis que 2 souches (**S11 ; S14B4**) soit 4% ont manifesté des activités antifongiques contre *Aspergillus brasiliensis*.

Ces résultats soulignent le potentiel et l'abondance des micro-organismes aquatiques en tant que source prometteuse de molécules bioactives. Leur diversité génétique, leur capacité à produire des métabolites secondaires spécialisés et leur aptitude à être cultivés en laboratoire offrent des opportunités de recherche pour découvrir de nouvelles molécules. L'identification et l'isolement de souches spécifiques présentant une activité antifongique prometteuse pourraient ouvrir la voie au développement de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement des infections fongiques.

De plus, nos résultats soulignent l'importance de la diversité microbienne présente dans les écosystèmes aquatiques et leur potentiel inexploité en tant que réservoirs de molécules biologiquement actives.

Il convient de noter que l'absence d'activité antibactérienne chez nos souches n'est pas un résultat négatif en soi. Les résultats obtenus peuvent seulement confirmer que les mécanismes d'action de ces souches ne sont pas efficaces contre les BMR testées dans le cadre de cette étude spécifique. Cependant, ces mêmes souches pourraient encore présenter des éventuelles activités biologiques bénéfiques non nécessairement révélées dans notre expérimentation.

En conclusion, cette étude ouvre de nouvelles perspectives de recherche dans le domaine de la découverte de nouveaux agents antifongiques à partir de sources naturelles, en particulier les souches d'origine aquatique. Ces résultats fournissent une base solide pour de futures investigations visant à identifier et à caractériser les composés actifs responsables de l'inhibition de *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, ce qui pourrait contribuer au développement de nouvelles thérapies antifongiques.

À la lumière des résultats obtenus, cette étude ouvre de nouvelles perspectives de recherche

- La recherche future devrait se concentrer sur la collecte et l'analyse d'avantage de souches aquatiques en utilisant des méthodes complémentaires d'évaluation de l'activité antifongique et en approfondissant la compréhension des interactions entre les micro-organismes aquatiques et les pathogènes fongiques.
- Les résultats suggèrent la nécessité de poursuivre les investigations pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux activités observées, par la génétique moléculaire en permettant l'identification des gènes codant pour les activités observées.
- Les souches bactériennes spécifiques qui ont démontré des activités antifongiques prometteuses contre *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans* pourraient constituer un point de départ pour des recherches ultérieures visant à caractériser les composés bioactifs responsables de ces activités.

- A -

Ameen, F., AlNadhari, S., & Al-Homaidan, A. A. (2021). Les micro-organismes marins comme source inexploitée de composés bioactifs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 224-231.

Arnaud, H., CHIMIE COMBINATOIRE, en bref, *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 7 juin 2023. URL: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/chimie-combinatoire-en-bref/>

- B -

Balian, E., Harrison, I., Butchart, S., Chambers, P., Cordeiro, J., Cumberlidge, N., & Yeo, D. (2010). Diversity of species in freshwater systems.

Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., & Boulahrouf, A. (2012, March). Activité antibactérienne d'espèces rares de *Streptomyces* contre des isolats cliniques multirésistants. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 70, No. 2, pp. 169-174).

Butler, M. S., Blaskovich, M. A. et Cooper, M. A. (2013). Antibiotiques en préparation clinique en 2013. *The Journal of antibiotics*, 66(10), 571-591.

- C -

Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*, 42(2), 6-21.

Centers for Disease Control and Prevention, 2013. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf?fbclid=IwAR2zAxRU1bmq9HROBvpzH4KBT6-xxyGhO6o8qyXsj8M1ILA4XyLY2VlrJCU>

Chaouch, C., Hassairi, A., Riba, M., & Boujaafar, N. (2014, September). Relations entre la résistance bactérienne et la consommation des antibiotiques. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 72, No. 5, pp. 555-60).

Cohen, R., & Rollet, V. (2013). Stratégies de traitement antibiotique des infections à BMR. *Archives de pédiatrie*, 5(20), H59-H60.

- D -

Daane, L.L., Harjono, I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleron, N.J. and Haggblom, M.M. 2002. PAH Degradation by *Paenibacillus* spp. And Description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. Nov., a Naphtalene Degrading Bacterium from the Rhizosphere of Salt March Plants. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52:131-139

Demoré, B., Grare, M., & Duval, R. E. (2018). Généralités sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation.

DiMasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of health economics*, 22(2), 151-185.

- E -

El Amraoui, B., El Amraoui, M., Cohen, N., & Fassouane, A. (2014). Anti-*Candida* and anti-*Cryptococcus* antifungal produced by marine microorganisms. *Journal de Mycologie Médicale*, 24(4), e149-e153.

El Amraoui, B., El Amraoui, M., Cohen, N., & Fassouane, A. (2014, March). Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 72, No. 2, pp. 107-111). Elsevier Masson.

- F -

Flury, P., Aellen, N., Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Fataar, S., Metla, Z., Dominguez-Ferreras, A., Bloemberg, G., Frey, J., Goesmann, A., Raaijmakers, J. M., Duffy, B., Höfte, M., Blom, J., Smits, T. H., Keel, C., et Maurhofer, M. (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. *The ISME journal*, 10(10), 2527–2542. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.5>

- G -

Gácsér, A., Stehr, F., Kröger, C., Kredics, L., Schäfer, W., & Nosanchuk, J. D. (2007). La lipase 8 affecte la pathogénèse de *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 75(10), 4710-4718.

Giacobbo, A., & Bernardes, A. M. (2022). Membrane separation process in wastewater and water purification. *Membranes*, 12(3), 259.

Girija Ganeshan, A. Manoj Kumar (2005) *Pseudomonas fluorescens*, un antagoniste bactérien potentiel pour contrôler les maladies des plantes, *Journal of Plant Interactions*, 1: 3, 123-134

**- H -**

Hazalin N. A., Ramasamy K., Lim S. M., Wahab I. A., Cole A. L. and Abdul Majeed A. B. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2009; 9: 46.

**- I -**

Ibrahimi, M. (2020). Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine (Doctoral dissertation, Université de Poitiers; Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc).

Ishnaiwer, M. (2022). Multimodal treatment of intestinal carriage of multi-drug resistant bacteria with probiotics and prebiotics (Doctoral dissertation, Nantes Université).

INSERM: Résistance aux antibiotiques. (Accessed May 2023) Available at .URL :<https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/>.

**- J -**

Jean-Cyr, G., CRIBLAGE, *pharmacochimie, Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 14 juin 2023. URL: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/criblage-pharmacochimie/>

**- K -**

Kacem, C. N., & Youcef-Ali, M. (2017). Etude de l'activité anti-Candida albicans des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides.

Kacem, C. N., & Youcef-Ali, M. (2017). Etude de l'activité anti-Candida albicans des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides

Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017). Action et mécanismes de résistance des antibiotiques: Guide pour les cliniciens. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 33(3), 300-305.

Krishna, Y., Nagendra, S., Chauhan, S., S., Deependra, S., Manju, R, S . (2020). Chapitre 1 Défis et besoins des vecteurs d'agents bioactifs et biologiques: une introduction, 1-3

**- L -**

Larpent, J. P., & Laarpent, G. M. (1990). *Mémento technique de microbiologie 2 ème Ed* Technique et documentaire Lavoisier.

**- M -**

Merzoug, A., & Chikhi, A. (2018). *Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1)*.

Muller, A. (2017). *Bon usage des antibiotiques : résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé (Doctoral dissertation, Université Bourgogne Franche-Comté)*.

**- O -**

Olishevskaya, S., & Déziel, É. *Criblage des bactéries et des champignons microscopiques possédant une activité antimicrobienne contre Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa*.

Organisation Mondiale de la santé. (2021), *Résistance aux antimicrobiens*, URL : [https://www.who.int/fr/newsroom/factsheets/detail/antimicrobialresistance?fbclid=IwAR1Sln\\_-IEEmiusrScTv7vldFXlprqRRWLcBFVHqrgS0024GT\\_75QCCChU](https://www.who.int/fr/newsroom/factsheets/detail/antimicrobialresistance?fbclid=IwAR1Sln_-IEEmiusrScTv7vldFXlprqRRWLcBFVHqrgS0024GT_75QCCChU)

**- P -**

Pakpour, N., & Horgan, S. (2021). *General microbiology lab manual*.

Paris, A., Domange, C., Eveillard, A., Canlet, C., Martin, P., Pineau, T., & Priymenko, N. (2008). *Métabolomique, métabonomique et les préoccupations en matière de sécurité alimentaire et de protection de la santé des consommateurs. Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 15(5), 300-304.

Pilmis, B. (2021). *Impact des Antibiotiques sur le microbiote digestif et l'émergence de bactéries multirésistantes (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay)*.

- R -

Rahal K. (2005) Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème édition, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière

Rios, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2-3), 127-149.

Rodier. (2009) Recherche et dénombrement des bactéries sulfito-réductrices et de leurs spores. In L'analyse de l'eau, 9ème édition. Paris : DUNOD, 2009, 775-786

Rowe-Magnus, D. et Mazel, D. (2006). L'évolution de la résistance aux antibiotiques. *Evolution of Microbial Pathogens*, 221-241.

Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121-1137.

- S -

Sally, Y.(2021). Mésusage des préconisés dans les infections des voies respiratoires (Thèse de doctorat, Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne-Paris 12).

Sanders, P., Bousquet-Mélou, A., Chauvin, C., & Toutain, P. L. (2011). Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRAE Productions Animales*, 24(2), 199-204.

Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J. et Huffnagle, G. B. (2014). Microbiologie, génomique et importance clinique du complexe d'espèces *Pseudomonas fluorescens*, un colonisateur méconnu des humains. *Examens de microbiologie clinique*, 27(4), 927-948.

Simard, F. (2013). Isolement, caractérisation et évaluation de l'activité antibactérienne de dérivés de dihydrochalcones hydroxycinnamylés issus de bourgeons de *populus balsamifera* L. Université du Québec à Chicoutimi.

- T -

Taale, E., Savadogo, A., Zongo, C., Tapsoba, F., Karou, S. D., & Traore, A. S. (2016). Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 384-399.

Tangcharoensathien, V., Sattayawutthipong, W., Kanjanapimai, S., Kanpravidh, W., Brown, R., & Sommanustweechai, A. (2017). Antimicrobial resistance: from global agenda to national strategic plan, Thailand. *Bulletin of the World Health Organization*, 95(8), 599.

- V -

Van Duin, D. et Paterson, D. L. (2016). Bactéries multirésistantes dans la communauté : tendances et leçons apprises. *Cliniques de maladies infectieuses*, 30(2), 377-390.

VIDAL. (2021), Gauzit ,R , Les nouveaux antibiotiques ciblant les bactéries multirésistantes. URL : <https://www.vidal.fr/actualites/27387-les-nouveaux-antibiotiques-ciblant-les-bacteries-multiresistantes.html?fbclid=IwAR1DdagtdICZcJoixKzfbB2hlJ8aaIW11jIf8DYP9Gb0IRnQI4M5aMO48BQ>

Vinod K.G., Vikas KN, Kalishankar M., 2010. Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(16), pp. 1656-1661.

- W -

Wang, W., Zhao, J., & Zhang, Z. (2022). *Bacillus* Metabolites: Compounds, Identification and Anti-*Candida albicans* Mechanisms. *Microbiology Research*, 13(4), 972-984.

- Y -

Yamaç, M., & Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical biology*, 44(9), 660-667.

Yumoto, I., Yamaga, S. and Sogabe, Y. 2003. *Bacillus Krulwichiae* sp. Nov., a Halotolerant Obligate Alkaliphile That Utilizes Benzoate and Hydroxybenzoate. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 53:1531-1536.

- Z -

Zhang, G. et Feng, J. (2016). La résistance intrinsèque des bactéries. *Yi chuan = Hereditas*, 38(10), 872–880.

Ziadi H. (2010). Essai d'amélioration du taux de rétention de la tétracycline dans un polymère à empreinte moléculaire formé de co-polymères fonctionnalisés de l'acide lactique. Thèse en vue de l'obtention du grade de maître en sciences pharmaceutiques option chimie médicinale, Université de Montréal: 1-2 4.

# **Annexes**

**Annexe I : Tableau I : Développement des nouveaux antibiotiques (Vidal,2021).**

Les nouveaux antibiotiques	Le nom des antibiotiques		AMM	Le Spectre d'action	
Les céphalosporines à activité anti-SARM	Ceftaroline ( <u>ZINFORO</u> )		Août 2012	Les SARM	
	Ceftobiprole ( <u>MABELIO</u> )		Avril 2014	Les Cocci à Gram positif	
Les molécules à spectre large	Deux cyclines	La tigécycline ( <u>TYGACIL</u> )	Juin 2005	Les Staphylocoques et les entérocoques résistants à la vancomycine, les Gram négatif et les <i>Acinetobacter baumannii</i> .	
		L'éravacycline ( <u>XERAVA</u> )	Septembre 2018		
	La délafloxacine ( <u>QUOFENIX</u> )		Fluoroquinolone	décembre 2019	Les SARM, La plupart des Staphylocoques à coagulase négative qui résistent aux autres fluoroquinolones.
Les molécules anti-Cocci à Gram positif	Dalbavancine ( <u>XYDALBA</u> )		Vancomycine	Avril 2015	Les Cocci à Gram positif, les entérocoques résistants à la vancomycine.
	Le tédizolide ( <u>SIVEXTRO</u> )		Linézolide	Mars 2015	Les SARM, les staphylocoques résistants au linézolide et les entérocoques résistants à l'amoxicilline.
Le renouveau de « vieilles molécules »	La témocilline ( <u>NEGABAN</u> [1, 2])		Ticarcilline	décembre 2013	Les bactéries à Gram négatif, à l'exception des non-fermentantes ( <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Acinetobacter spp</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )
	La colistine ( <u>COLIMYCINE</u> )			Début des années 2000	Les aérobies à Gram négatif (entérobactéries, bactéries à Gram négatif non fermentantes, <i>Haemophilus influenzae</i> , etc.)

**Tableau I (suite) :** Développement des nouveaux antibiotiques (Vidal,2021).

<b>Les molécules anti-Cocci à Gram positif</b>	Ceftolozane/tazobactam ( <u>ZERBAXA</u> )		octobre 2015	Les entérobactéries multirésistantes
	Ceftazidime-avibactam ( <u>ZAVICEFTA</u> )		Juin 2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et la plupart des souches de BLSE
	Méropénem-vaborbactam ( <u>VABOREM</u> )		novembre 2018	Les carbapénémases de type KPC
	L'imipénème/rélébactam ( <u>RECARBRIO</u> )		février 2020	Les résistances dues à une KPC et de nombreux <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistants.
	Céfiderocol ( <u>FETCROJA</u> )	Céphalosporine		Juin 2020

**Tableau II :** Les mécanismes de résistances (Kappor *et al.*,2017).

Classe d'antibiotiques	Type de résistance	Mécanisme de résistance	Exemple
<b>Aminoglycosides</b>	Diminution de l'absorption	Modifications de la membrane externe	<i>P. aeruginosa</i>
	Modification enzymatique	AGE's	Bactéries à Gram négatif
<b>Béta-lactamines</b>	Altération de la PLP	PLP 2a	Mec A dans <i>S. aureus</i> , CONS, <i>S. pneumoniae</i>
	Dégradation enzymatique	Pénicillinase qui sont classées selon la Classification ambler	Bactéries à Gram négatif
<b>Glycopeptides</b>	Altération de cible	La D-alanyl-alanine est changée en D-alanyl-D-lactate	Résistance à la vancomycine chez <i>E. faecium</i> et <i>E. faecalis</i>
<b>Macrolides</b>	Altération de cible	Méthylation du site actif ribosomal avec liaison réduite	Méthylases codées par l'erm chez <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> et <i>S. pyogenes</i>
<b>Oxazolidinones</b>	Pompes à efflux	Pompe de type MEF	<i>S. pneumoniae</i> et <i>S. pyogenes</i>
	Altération de cible	Mutation conduisant à une liaison réduite au site actif	<i>E. faecium</i> et <i>S. aureus</i>

**Tableau II (suite) : Les mécanismes de résistances (Kappor *et al.*,2017).**

<b>Quinolones</b>	Altération de cible	Mutation conduisant à une liaison réduite au site actif	Mutations du gyr A chez les bactéries entériques Gram négatif et <i>S. aureus</i>
	L'efflux actif	Nouveaux transporteurs membranaires	Mutations dans gyr A et par C chez <i>S. pneumoniae</i> . Nor-A chez <i>S. aureus</i>
<b>Tétracyclines</b>	L'efflux actif	Nouveaux transporteurs membranaires	tet codant pour des protéines d'efflux chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives
	Altération de cible	Production de protéines qui se lient au ribosome et modifient la conformation du site actif	tet (M) et tet (O) dans les espèces de bactéries Gram-positives et espèces de bactéries à Gram négatif
<b>Chloramphénicol</b>	Inactivation d'antibiotique	Chloramphénicol acétyl transférase	CAT dans <i>S. pneumonia</i>
	Pompes à efflux	Nouveaux transporteurs membranaires	Efflux du gène cml A et du gène flo chez <i>E. coli</i>
<b>Sulfamides</b>	Altération de cible	Mutation de gènes codant pour la DHPS	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>

DHPS=Dihydropteroate synthase, *P. aeruginosa*=*Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*=*Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*=*Streptococcus pneumoniae*, *E. faecium*=*Enterococcus faecium*, *E. faecalis*=*Enterococcus faecalis*, *S.pyogenes*=*Streptococcus pyogenes*, *E. coli*=*Escherichia coli*, PLP=Protéine de liaison à la Pénicilline, AGE's=Aminoglycoside modifying enzymes, CAT=Chloramphénicol acetyl transferases

**Annexe II : Tableau IV : Appareillage et Verreries**

<b>Appareillage</b>	<b>Verreries</b>	<b>Autre matériel</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autoclave kronosB23</li> <li>• Bain marie Précision</li> <li>• Etuve JOUAN</li> <li>• Réfrigérateur</li> <li>• Microscope optique</li> <li>• PH-mètre</li> <li>• Balance électrique</li> <li>• Haut LN120</li> <li>• POUPINELLE MEMMERT</li> <li>• Rampe de filtration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Becher</li> <li>• Boite de pétrie</li> <li>• Erlenmeyer</li> <li>• Tubes à essaie</li> <li>• Lame et lamelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anses de platine</li> <li>• Ecouvillons</li> <li>• Pipettes pasteur</li> <li>• Pince en platine</li> <li>• Pissettes</li> <li>• Tubes Eppendorf</li> <li>• Bec benzène</li> <li>• Micro pipette 50ul</li> <li>• Seringue</li> </ul>

**Tableau III : Les germes tests.**

<b>Germes tests</b>	<b>Espèce</b>	<b>Provenance</b>
<b>Souches bactériennes</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Etablissement hospitalier
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Etablissement hospitalier
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Etablissement hospitalier
<b>Souches fongiques</b>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

**Annexe IV :**



**Figure n°4 :** Mesure de la température (Originale).



**Figure n° 5 :** Mesure de pH par le pH-mètre (Photo originale).



**Figure n° 6 :** Test de chlore par la méthode de DPD (Photo originale).

**Annexe V :**



**Figure n° 7 :** test de catalase (Photo originale).



**Figure n° 8:** test d'oxydase (Photo originale).

<b>Observation</b>	 Culture à la surface	 Culture partout sauf à la surface	 Culture dans tout le tube	 Culture qu'à un endroit précis du tube.
<b>Interprétation</b>	Culture seulement en présence d'O <sub>2</sub>	Culture seulement en absence d'O <sub>2</sub>	Culture quelque soit la concentration en O <sub>2</sub>	Culture en présence d'une concentration d'O <sub>2</sub> < à celle de l'air
<b>Conclusion</b>	Type aérobie strict	Type anaérobie strict	Type aéro-anaérobie facultatif	Type microaérophile

**Figure n° 9:** Expression des résultats de la recherche du type respiratoire su milieu VF

**Annexe VI:****Tableau V : Résultats de la mesure de température et de pH.**

<b>Echantillons</b>	<b>Température</b>	<b>PH</b>	<b>Chlore</b>
<b>S1</b>	9,4	7,49	Négative
<b>S2</b>	9,6	7,71	Négative
<b>S3</b>	8,9	7,88	Négative
<b>S4</b>	12,3	6,94	Négative
<b>S5</b>	11,8	7,28	Négative
<b>S6</b>	10,8	7,4	Négative
<b>S7</b>	10,8	7,22	Négative
<b>S8</b>	9,3	7,3	Négative
<b>S9</b>	13,8	7,5	Négative
<b>S10</b>	8,2	7,46	Négative
<b>S11</b>	4	7,38	Négative
<b>S12</b>	4,5	7,8	Négative
<b>S13</b>	5	7,36	Négative
<b>S14</b>	9	7,67	Négative
<b>S15</b>	8,5	7,3	Négative
<b>S16</b>	15,1	7,43	Négative
<b>S17</b>	8,5	7,45	Négative
<b>S18</b>	11,8	7,96	Négative
<b>S19</b>	14,5	7,98	Négative
<b>S20</b>	19,3	7,81	Négative
<b>S21</b>	10	7,02	Négative
<b>S22</b>	15,1	7,08	Négative
<b>S23</b>	10,2	7,4	Négative
<b>S24</b>	10,5	7,3	Négative
<b>S25</b>	10,1	7,53	Négative
<b>S26</b>	10,5	7,35	Négative
<b>S27</b>	12	7,24	Négative
<b>S28</b>	10,7	7,66	Négative
<b>S29</b>	10,4	7,84	Négative
<b>S30</b>	10,6	7,35	Négative
<b>S31</b>	15	7,66	Négative

Annexe VII :

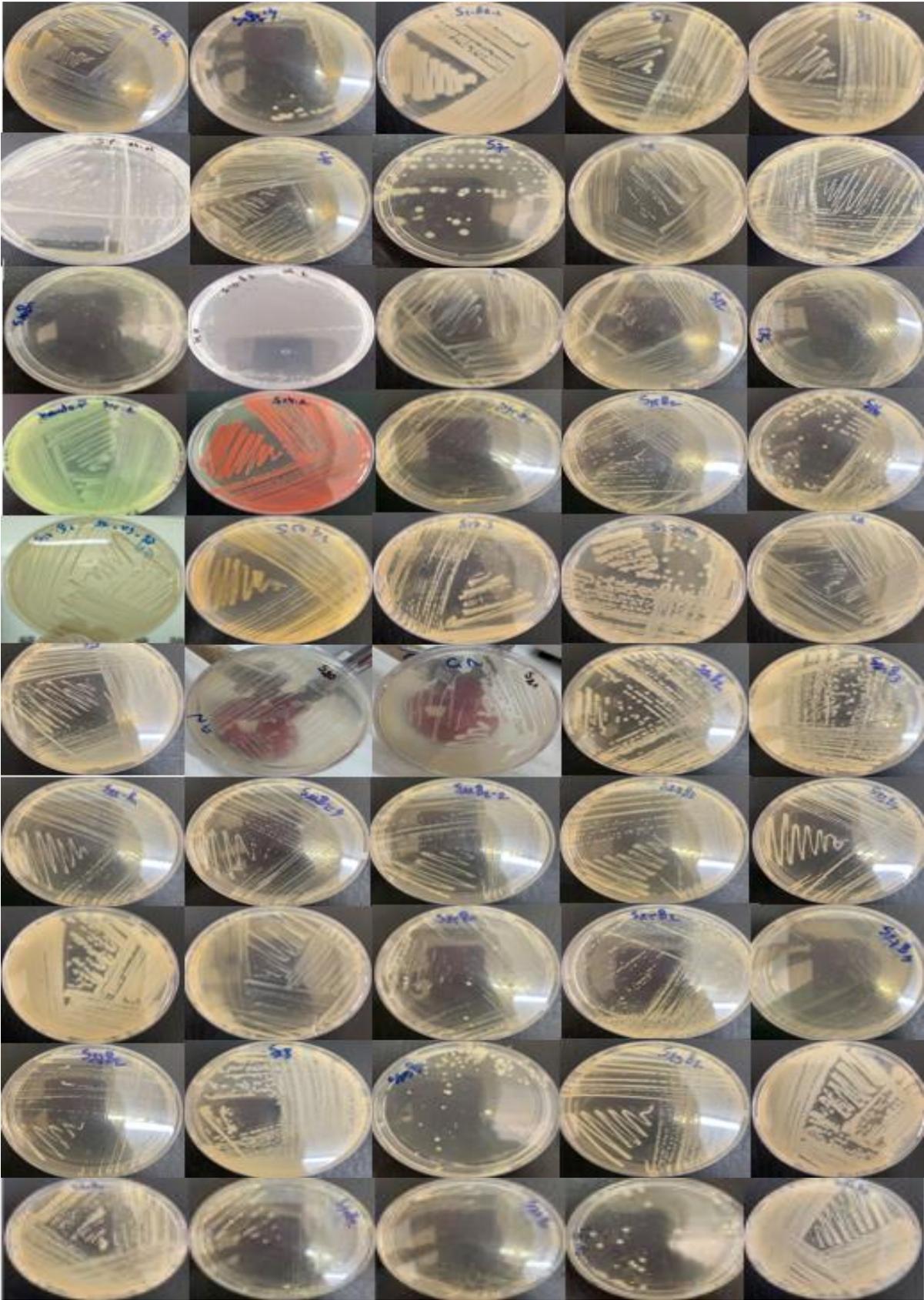


Figure n°12 : Résultats de l'isolement et purification des souches

Annexe VIII :

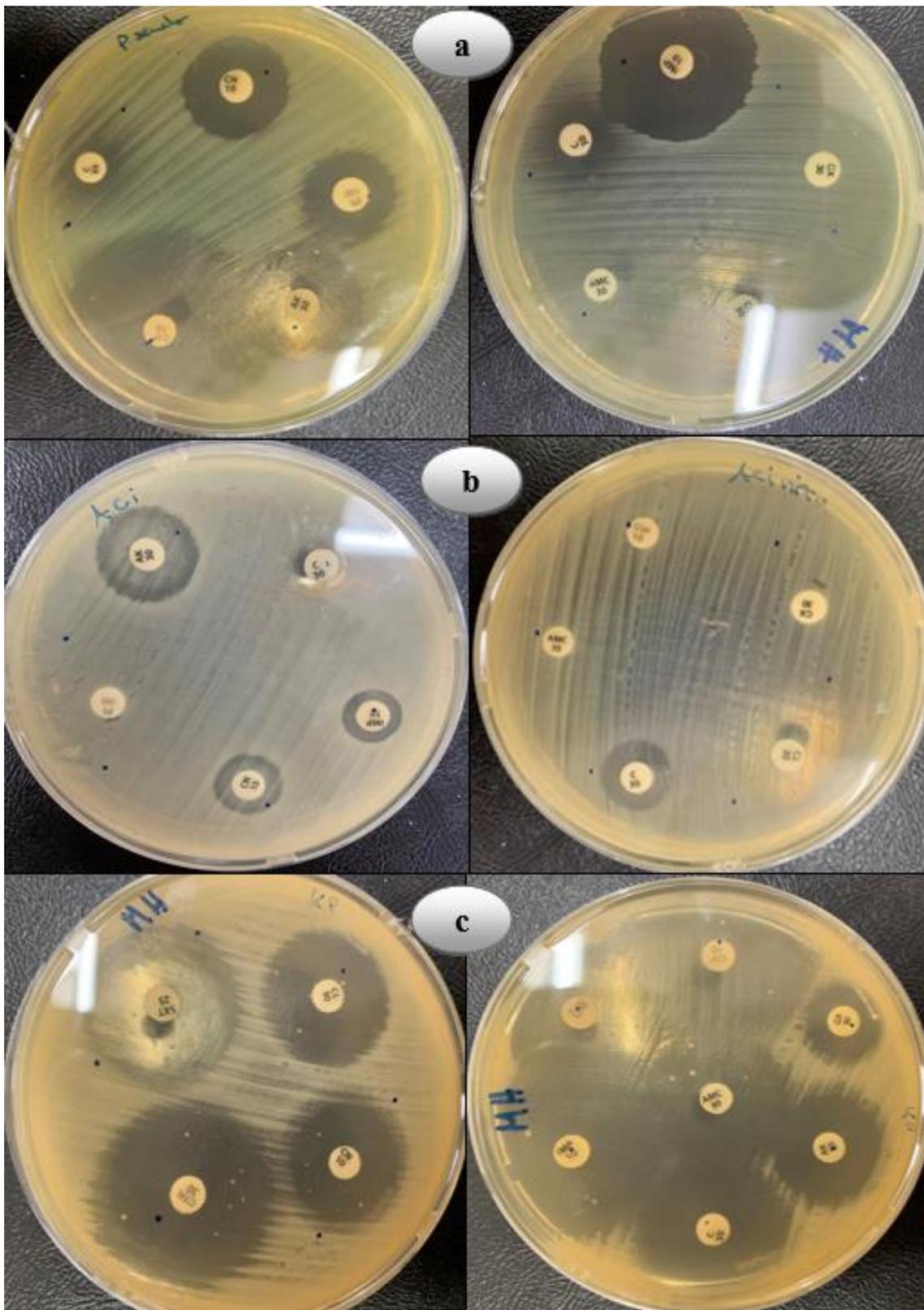


Figure n°22 : Résultats de confirmation de profil de résistances des BMR : a) *P. aeruginosa* ;  
b) *A. pneumoniae* ; c) *K. baumannii* (Photo originale).

**Annexe VIII (Suite) :**

**Tableau VII : Résultats de la méthode des disques sur agar**

Les souches	Activité antibactérienne						Activité antifongique			
	Les Bactéries multirésistantes						Les champignons ATCC			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
<b>S1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S1B2-1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S1B2-2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S3</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S5</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S6</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S7</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S8</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S9</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S10B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S10B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S11</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	12mm	+	9mm	-
<b>S12</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S13</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S14B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	24mm	+	17mm	+
<b>S14B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S15B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S15B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S16</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S17B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S17B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	11mm	+	9mm	-
<b>S17B3</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S17B4</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	10mm	+	13mm	+
<b>S18</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	11mm	+	9mm	-

**Tableau VII (Suite) : Résultats de la méthode des disques sur agar**

<b>S19</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S20</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	22mm	-	16mm	+
<b>S21B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S21B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S21B3</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S22B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S22B2-1</b>	9mm		9mm		9mm		9mm	-	9mm	-
<b>S22B2-2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S22B3</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S23B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S23B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S24</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S25B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S25B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S27B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S27B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S28</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S29B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	11mm	+	9mm	-
<b>S29B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S29B3</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S30B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S30B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S31B1</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S31B2</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-
<b>S31B3</b>	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-	9mm	-

= 9mm : activité négative / > 9mm : activité positive

+ = Présence d'activité / - = Absence d'activité

**Annexe VIII (suite) :**

**Tableau VIII :** Résultats de la méthode de diffusion des puits d'agar.

Les Souches isolées	Activité antibactérienne						Activité antifongique			
	Les Bactéries multirésistantes						Les champignons ATCC			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
<b>S1</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S1B2-1</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S1B2-2</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	9mm	+
<b>S2</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S3</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S5</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S6</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S7</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S8</b>	6mm	-	6mm	+	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S9</b>	6mm	-	6mm	+	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S10B1</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S10B2</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S11</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	7mm	-	6mm	-
<b>S12</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S13</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S14B1</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	19mm	+	14mm	+
<b>S14B2</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S15B1</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S15B2</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S16</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S17B1</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S17B2</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S17B3</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-
<b>S17B4</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	23mm	+
<b>S18</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-

**Tableau VIII (suite) : Résultats de la méthode de diffusion des puits d'agar.**

<b>S19</b>	6mm	-								
<b>S20</b>	6mm	-								
<b>S21B1</b>	6mm	-								
<b>S21B2</b>	6mm	-								
<b>S21B3</b>	6mm	-								
<b>S22B1</b>	6mm	-								
<b>S22B2-1</b>	6mm		6mm		6mm		6mm	-	6mm	-
<b>S22B2-2</b>	6mm	-								
<b>S22B3</b>	6mm	-								
<b>S23B1</b>	6mm	-								
<b>S23B2</b>	6mm	-								
<b>S24</b>	6mm	-								
<b>S25B1</b>	6mm	-								
<b>S25B2</b>	6mm	-								
<b>S27B1</b>	6mm	-								
<b>S27B2</b>	6mm	-								
<b>S28</b>	6mm	-								
<b>S29B1</b>	6mm	-								
<b>S29B2</b>	6mm	-								
<b>S29B3</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	8mm	+
<b>S30B1</b>	6mm	-	6mm	-	6mm	-	6mm	-	8mm	+
<b>S30B2</b>	6mm	-								
<b>S31B1</b>	6mm	-								
<b>S31B2</b>	6mm	-								
<b>S31B3</b>	6mm	-								

= 6mm : activité négative / > 6mm : activité positive

+ = Présence d'activité / - = Absence d'activité

**Annexe IX :**

**Tableau IX :** Résultats d'étude macroscopique des souches

Souches	Aspect des colonies							
	Taille	Forme	Contour	Relief	Opacité	Couleur	Consistance	Aspect de surface
<b>S1B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Jaunâtre	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S1B2-1</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S1B2-2</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Mate
<b>S2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S3</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S5</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S6</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S7</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S8</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S9</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S10B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S10B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S12</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S13</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S14B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Verte	Crémeuse	Lisse brillante
<b>S14B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Rouge	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S15B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Jaunâtre	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S15B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S16</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S17B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Blanche	Crémeuse	Lisse brillante
<b>S17B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Beige	Sèche	Lisse Matte
<b>S17B3</b>	Petite	Irrégulier	Régulier	Bombée	Opaque	Jaunâtre	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S17B4</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S18</b>	Moyenne	Circulaire	Ondule	Plate	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S19</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante

**Tableau IX (suite) : Résultats d'étude macroscopique des souches**

<b>S20</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S21B1</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S21B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Blanche	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S21B3</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Blanche	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S22B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Blanche	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S22B2-1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S22B2-2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S22B3</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S23B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S23B2</b>	Moyenne	Irrégulier	Ondule	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	<b>Lisse Matte</b>
<b>S24</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S25B1</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S25B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S27B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S27B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S28</b>	Moyenne	Irrégulier	Ondule	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S29B1</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Blanche	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S29B2</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S29B3</b>	Moyenne	Irrégulier	Régulier	Bombée	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S30B1</b>	Moyenne	Irrégulière	Ondule	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S30B2</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Bombée	Opaque	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S31B1</b>	Petite	Circulaire	Régulier	Bombée	Translucide	Beige	Crémeuse	Lisse Brillante
<b>S31B2</b>	Moyenne	Circulaire	Ondule	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte
<b>S31B3</b>	Moyenne	Circulaire	Régulier	Plate	Opaque	Blanche	Sèche	Lisse Matte

**Annexe IX (suite) :**

**Tableau X:** Résultats de la coloration de Gram.

Souches bactériennes	Gram	Forme	Type de regroupement	Spore
S1B1	+	Diplocoques	Isolés	/
S1B2-1	+	Coccobacilles	Isolés	/
S1B2-2	+	Bacilles	En chaînette	Présent
S2	-	Cocci	Isolés	/
S3	-	Bacilles	Isolés	Présent
S5	-	Bacilles	Isolés	/
S6	+	Cocci	Isolés	/
S7	+	Bacilles	En chaînette	Présent
S8	+	Bacilles	En chaînette	/
S9	+	Bacilles	En amas	/
S10B1	-	Coccobacilles	Isolés	/
S10B2	-	Bacilles	Isolés	/
S11	-	Bacilles	Isolés	/
S12	-	Coccobacilles	Isolés	/
S13	-	Bacilles	En amas	/
S14B1	-	Bacilles	Isolés	/
S14B2	-	Cocci	Isolés	/
S15B1	+	Tétra-coques	En amas	/
S15B2	-	Coccobacilles	En amas	/
S16	+	Bacilles	En chaînette	Présent
S17B1	+	Tétra-coques	Isolés	/
S17B2	+	Coccobacilles	En amas	/
S17B3	+	Bacilles	En chaînette	/
S17B4	+	Bacilles	En amas	Présent
S18	-	Bacilles	Isolés	/
S19	+	Coccobacilles	Isolés	/
S20	+	Bacilles	Isolés	Présent
S21B1	+	Diplocoques	Isolés	/

**Tableau X (suite) : Résultats de la coloration de Gram.**

S21B2	+	Bacilles	En chaînette	Présent
S21B3	+	Bacilles	En chaînette	Présent
S22B1	+	Coccobacilles	Isolés	/
S22B2-1	+	Coccobacilles	Isolés	/
S22B2-2	+	Coccobacilles	Isolés	/
S22B3	-	Coccobacilles	Isolés	/
S23B1	-	Cocci	En amas	/
S23B2	+	Bacilles	En chaînette	Présent
S24	-	Cocci	Isolés	/
S25B1	+	Bacilles	En chaînette	/
S25B2	+	Coccobacilles	En amas	/
S27B1	-	Diplocoques	Isolés	/
S27B2	+	Cocci	En amas	/
S28	-	Bacilles	En chaînette	Présent
S29B1	+	Bacilles	Isolés	/
S29B2	+	Coccobacilles	Isolés	/
S29B3	+	Bacilles	Isolés	Présent
S30B1	-	Cocci	Isolés	/
S30B2	+	Bacilles	Isolés	Présent
S31B1	+	Diplocoques	Isolés	/
S31B2	+	Bacilles	En chaînette	Présent
S31B3	+	Bacilles	En chaînette	Présent

**Annexe IX (suite) :****Tableau XI : Résultats des tests biochimiques.**

Souches isolées	Catalase	Oxydase
S1B1	+	+
S1B2-1	+	+
S1B2-2	+	+
S2	+	+
S3	+	+
S5	+	+
S6	+	+
S7	+	+
S8	+	-
S9	+	+
S10B1	+	+
S10B2	+	+
S11	+	+
S12	+	/
S13	+	/
S14B1	+	+
S14B2	+	+
S15B1	+	/
S15B2	+	/
S16	+	/
S17B1	+	/
S17B2	+	/
S17B3	+	/
S17B4	+	-
S18	+	+
S19	+	/
S20	+	+
S21B1	+	/
S21B2	+	/

**Tableau XI (suite) : Résultats des tests biochimiques.**

S21B3	+	/
S22B1	+	/
S22B2-1	+	/
S22B2-2	+	/
S22B3	+	/
S23B1	+	/
S23B2	+	/
S24	+	/
S25B1	+	/
S25B2	+	/
S27B1	+	/
S27B2	+	/
S28	+	/
S29B1	+	-
S29B2	+	/
S29B3	+	-
S30B1	+	-
S30B2	+	/
S31B1	+	/
S31B2	+	/
S31B3	+	/

## **Annexe X : Mode opératoire de la galerie API 20 NE**

### **❖ Préparation de l'inoculum :**

Il convient d'initier la manipulation en rompant une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml). Par la suite, avec grande précaution, se munir d'une pipette et prélever de manière successive, par impulsions équivalentes à une opacité de 0,5 de McFarland, entre 1 et 4 colonies de morphologie identique. Afin d'optimiser la réussite de l'opération, privilégier l'utilisation de cultures jeunes (18-24 heures).

### **❖ Inoculation de la galerie**

- Les tubes utilisés pour les tests NO<sub>3</sub> à PNPG doivent être remplis avec la suspension précédente plutôt que les cupules.
- Prenez une ampoule d'API AUX Medium et transférez environ 200 µl de la suspension précédente. Assurez-vous d'homogénéiser la suspension à l'aide de la pipette sans créer de bulles.
- Remplissez les tubes et les cupules des tests GLU à PAC, en prenant soin de créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, jamais concave.
- Pour former un ménisque convexe, remplissez les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) avec de l'huile de paraffine.
- Refermez la boîte d'incubation et laissez-la incuber à une température de 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

**Lecture de la galerie :** Après incubation, lire les réactions en se reportant au Tableau de Lecture. (bioMérieux ,2009)

## Annexe X (suite) :

**Tableau : Lecture de la galerie Api 20NE (bioMérieux ,2009)**

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0.136	reduction of nitrates to nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			reduction of nitrates to nitrogen	colorless	pink-red
TRP	L-tryptophane	0.2	indole production (TRyptophane)	Zn / 5 min	
GLU	D-glucose	1.92	fermentation (GLUcose)	pink	colorless
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	JAMES / immediate	
URE	urea	0.76	UREase	colorless	pink
ESC	esculin ferric citrate	0.56 0.072	hydrolysis (β-glucosidase) (ESCulin)	pale green / yellow	yellow
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	blue to green	orange / pink / red
PNPG	4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	0.22	β-galactosidase (Para-NitroPhenyl-β-D-Galactopyranosidase)	yellow	orange / pink / red
[GLU]	D-glucose	1.56	assimilation (GLUcose)	yellow	grey / brown / black
[ARA]	L-arabinose	1.4	assimilation (ARAbinose)	no pigment diffusion	diffusion of black pigment
[MNE]	D-mannose	1.4	assimilation (ManNosE)	colorless	yellow
[MAN]	D-mannitol	1.36	assimilation (MANnitol)	transparent	opaque
[NAG]	N-acetyl-glucosamine	1.28	assimilation (N-Acetyl-Glucosamine)	transparent	opaque
[MAL]	D-maltose	1.4	assimilation (MALtose)	transparent	opaque
[GNT]	potassium gluconate	1.84	assimilation (potassium GlucoNate)	transparent	opaque
[CAP]	capric acid	0.78	assimilation (CAPric acid)	transparent	opaque
[ADI]	adipic acid	1.12	assimilation (ADIpic acid)	transparent	opaque
[MLT]	malic acid	1.56	assimilation (MaLaTe)	transparent	opaque
[CIT]	trisodium citrate	2.28	assimilation (trisodium CITrate)	transparent	opaque
[PAC]	phenylacetic acid	0.8	assimilation (PhenylACetic acid)	transparent	opaque
OX	(see oxidase test package insert)	-	cytochrome oxidase	(see oxidase test package insert)	

## Annexe X : Mode opératoire de L`Api NH

### ❖ Préparation de l'inoculum

Prélevez plusieurs colonies bien isolées et réalisez une suspension ayant une opacité égale à celle de l'étalon 4 de McFarland. Veillez à bien homogénéiser la suspension et utilisez de préférence des cultures jeunes âgées de 18-24 heures.

### ❖ Inoculation de la galerie

- Assembler le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation. Marquer la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

- Répartir la suspension bactérienne antérieure dans les cavités en évitant de créer des bulles.

- Remplir uniquement la partie tubulaire des sept premiers micro-tubes (PEN à URE) avec environ 50 µl.

- Remplir le tube et la cavité des trois derniers micro-tubes, LIP/ProA, PAL/GGT, βGAL/IND : 150 µl environ, en faisant attention de ne pas créer un ménisque convexe.

- Couvrir les sept premiers tests (PEN à URE) avec de l'huile de paraffine.

- Fermer la boîte d'incubation et incuber pendant 2 à 2 H 15 à 36°C ± 2°C en atmosphère aérobie.

**Lecture de la galerie :** Après incubation, lire les réactions en se reportant au Tableau de Lecture. (bioMérieux ,2016)

**Tableau :** Lecture de la galerie Api *Neisseria*. (bioMérieux ,2016)

TABLEAU DE LECTURE					
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
1) <u>PEN</u>	potassium benzylpenicilline	1,36	PENicillinase	bleu  (absence de pénicillinase)	jaune jaune-vert jaune-bleu (présence de pénicillinase)
2) <u>GLU</u>	D-glucose	0,5	acidification (GLUcose)	rouge rouge-orangé	jaune orange
3) <u>FRU</u>	D-fructose	0,1	acidification (FRUctose)		
4) <u>MAL</u>	D-maltose	0,1	acidification (MALtose)		
5) <u>SAC</u>	D-saccharose	0,5	acidification (SACcharose)		
6) <u>ODC</u>	L-ornithine	0,552	Ornithine DéCarboxylase	jaune-vert gris-vert	bleu
7) <u>URE</u>	urea	0,41	UREase	jaune	rose-violet
8a) <u>LIP</u>	5-bromo-3-indoxyl-caprate	0,033	LIPase	incolore gris pâle	bleu (+ précipité)
9a) <u>PAL</u>	4-nitrophényl-phosphate 2CHA	0,038	Phosphatase ALcaline	incolore jaune pâle	jaune
10a) <u>βGAL</u>	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,04	β GALactosidase	incolore	jaune
8b) <u>ProA</u>	L-proline-4-méthoxy-β-naphtylamide	0,056	Proline Arylamidase si LIP est +, ProA est toujours –	<u>ZYM B / 3 min</u> jaune orange pâle (brun si LIP +)	
9b) <u>GGT</u>	γ-glutamyl-4-méthoxy-β-naphtylamide	0,049	Gamma-Glutamyl Transférase	<u>ZYM B / 3 min</u> jaune orange pâle (jaune-orange si PAL +)	
10b) <u>IND</u>	L-tryptophane	0,036	INDole	<u>JAMES / 3 min</u> incolore rose	

**Annexe XI :**

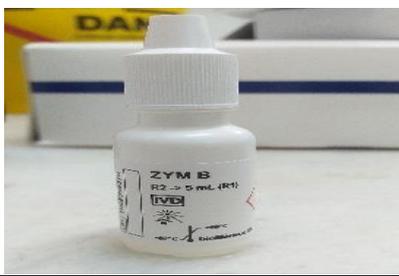
**Tableau XIV :** Résultats de la recherche du type respiratoire

Souches isolées	Type respiratoire
S1B2-2	Aérobies stricts
S17B2	Aérobies stricts
S17B4	Aérobies stricts
S20	Aérobies stricts
S29B3	Aéro-anaérobie facultatif

**Annexe XII:** Composition des milieux de culture

<b>Milieu</b>	<b>Composition</b>
<b>Gélose nutritive</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extrait de viande..... 3 g</li> <li>• Extrait de levure .....3 g</li> <li>• Peptone ..... 10g</li> <li>• Chlorure de sodium .....5 g</li> <li>• Agar-agar .....18 g</li> <li>• PH .....7,3</li> </ul>
<b>Gélose Sabouraud</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptone ..... 10 g</li> <li>• Glucose .....20 g</li> <li>• Agar-agar .....15 g</li> <li>• Eau distillée qsp..... 1 l</li> <li>• PH .....6</li> </ul>
<b>Mueller Hinton</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydrolysât acide de caséine 17,5 g</li> <li>• Infusion de viande..... 2,0 g</li> <li>• Amidon soluble .....1,5 g</li> <li>• Agar-agar.....17 g</li> <li>• PH .....7,3</li> </ul>
<b>Bouillon cœur-cervele (BHIB)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Digestion enzymatique de tissus animaux.....10.0 g</li> <li>• Infusion De Cervele De Veau Déshydratée.....12.5 g</li> <li>• Infusion de cœur de bœuf déshydraté.....5.0 g</li> <li>• Glucose..... 2.0 g</li> <li>• Chlorure de sodium ... 5.0 g</li> <li>• Hydrogénophosphate disodique, anhydre.....2,5 g</li> </ul>
<b>Gélose Coliformes Chromocult CCA</b>	
<b>Gélose viande foie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptone viande-foie... 30,0 g</li> <li>• Glucose..... 2,0 g</li> <li>• Agar..... 6,0 g</li> <li>• Amidon soluble ... 2,00</li> <li>• PH..... 7,4</li> </ul>

### Annexe XIII : Réactifs et solution

Réactif	Composition	Photo
NIT 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Acide sulfanilique .....0,4 g</li> <li>Acide acétique...30 g</li> <li>H2O.....70 ml</li> </ul>	
NIT 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>N, N-diméthyl-1-naphtylamine...0,6 g</li> <li>Acide acétique...30 g</li> <li>H2O.....70 ml</li> </ul>	
James	<ul style="list-style-type: none"> <li>R1 : HCl 1N.100 ml</li> <li>R2 : Composant J 2183 .....0,66 g</li> </ul>	
Zym B	<ul style="list-style-type: none"> <li>Methanol..... 30 ml</li> <li>Dimethyl-sulfoxyde (DMSO)..... 70 ml</li> <li>Fast Blue BB....0.14 g</li> </ul>	
I NaCl 0,85 % Medium 2 mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chlorure de sodium .....8,5 g</li> <li>Eau déminéralisée .....1000 ml</li> </ul>	

API AUX Medium 7 ml

- Sulfate d'ammonium  
.....2 g
- Agar..... 1,5 g
- Solution de  
vitamines... 10,5 ml
- Solution d'oligo-  
éléments.....10 ml
- Phosphate mono-  
sodique...6,24 g
- Chlorure de  
potassium.....1,5 g
- Eau déminéralisée  
qsp..... 1000 ml
- pH.....7,0-7,2



