



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie et environnement

Spécialité : *Ecologie microbienne*

Intitulé :

La recherche de *Vibrio cholerae* dans les eaux usées de Oued Boumerzoug, Oued Rhumel et la STEP d'Ibn Ziad

Présenté et soutenu par : Belbekri Raounek

Le : 31/09/2020

Abderrahim Nassima Ines

Jury d'évaluation :

Président du jury : Bouzeraib Latifa (Maître-Assistante « A » - UFM Constantine).

Rapporteur : Chabbi Rabah (Maître-Assistant « A » - UFM Constantine).

Co-encadreur : Khelifa Foudil (Maître de conférences « A » - Faculté de médecine).

Examineurs : Guergouri Ibtissem (Maître-assistante « A » - UFM Constantine).

Année universitaire
2019- 2020

Remerciements

Nous tenons à formuler nos remerciements à Mr. Chabbi Rabeh (Maître assistant « A » - UFM Constantine), Pour son encadrement et son orientation, pour l'aide précieuse qu'il nous a apporté, ainsi que les remarques et tous les conseils qu'il nous a prodigué pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance et notre profonde gratitude et respect.

Nos remerciements vont également au Pr. Khelifa Foudil (Maître de conférences A, responsable de l'Annexe de l'Institut Pasteur de Constantine, laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Constantine), de nous avoir accueilli avec la plus grande bienveillance au sein du laboratoire d'hygiène, de nous avoir orienté pour la réalisation de ce mémoire et pour la mise à notre disposition des moyens qui étaient de son ressort. Et qui nous a fait l'honneur d'accepter de co-encadrer notre modeste travail. Nous lui exprimons toute notre humble reconnaissance et notre affection.

Nos sentiments de reconnaissance vont également à Mme Bouzeraib Latifa (Maître-Assistante « A » - UFM Constantine), pour l'honneur qu'elle nous a accordé en acceptant de présider le jury.

Nos vifs remerciements à Mme Guergouri Ibtissem (Maître-Assistante « A » - UFM Constantine), qui nous a fait l'honneur de faire partie du jury et d'examiner notre travail, merci pour le temps que vous y avez consacré.

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements au personnel du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Constantine, pour l'encadrement technique :

- Mr Bachlam Nacer, chef de service du laboratoire pour son accueil et sa bienveillance au cours de notre stage, pour qui nous exprimons notre profonde reconnaissance.

- Mme Rouag khadidja, pour l'aide qu'elle nous a réservé durant toute la période de notre stage, de nous avoir soutenu et dirigé. Pour sa fidélité et son dévouement. Qu'elle trouve ici le témoignage de notre sincère admiration et reconnaissance.

- Mme Youcefi Wahiba, qui nous a inspiré ce sujet et qui nous a guidé tout au long de son élaboration et aussi de nous avoir suivie de très près. Nous lui sommes reconnaissantes pour tous les efforts consentis, ainsi que pour ses conseils pleins de clarté.

- Mme Bendali Brahem Maya, pour nous avoir guidé, prodigué des conseils et soutenu durant tout notre travail.

- Mme Belhafef Mouni, pour l'aide précieuse qu'elle nous a procuré au cours de ce mémoire.

Veillez trouver en ce modeste travail l'expression de notre profonde gratitude.

- Nous remercions également Mme Belbekri Wassila, ainsi que tout le reste du personnel du laboratoire, pour leur accueil plus que chaleureux dans l'unité d'hygiène et pour leur soutien moral, leur encouragement et leur gentillesse.

Nos remerciements vont également à Mme Bousbiat Mouni, pour toute l'aide qu'elle nous a apporté en nous permettant d'accéder à la STEP d'Ibn Ziad. Nous vous adressons, notre vive reconnaissance.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A mes parents

A mon père, et à ma mère, dont l'amour et l'affection m'ont éclairé le chemin du succès. Votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force. Ce travail est le fruit de nombreux sacrifices consentis à mon égard. La plus belle marque de reconnaissance que je puisse vous offrir est ma réussite.

A ma grande sœur

A celle qui a toujours su m'encourager et me soutenir. Ma complice dans la vie, en témoignage de l'affection que j'ai pour toi. L'aide que tu n'as cessé de me prodiguer, le réconfort moral que tu m'as toujours manifesté, je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.

A ma grand-mère

Pour sa présence, ses encouragements, sa bonne foi et son extrême tendresse.

A mon oncle Belbekri Toufik

Pour ces sages conseils et son assistance tout au long de mes études. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A tous les membres de ma chère famille maternelle et paternelle

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde affection.

A mes amis

Mon binôme Ines et sans oublier Houda et Maroua.

Raounek

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A toute ma famille, **Abderrahim et Filali***

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur. A ma bien aimé maman **Filali Chafia** celle qui m'a donné sa vie, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens et les sacrifices dont elle a fait jours et nuits preuve à mon égard.*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, a celui qui m'a élevé sur l'honnêteté et la sincérité, a celui qui m'a appris à me tenir debout face aux difficultés .A mon cher père **Mohammed Zein Eddine**, que Dieu te garde pour nous.*

A mes oncles et tantes paternelle et maternelles particulièrement ma tante Souad, des mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon respect que j'ai pour vous, je vous remercier amplement de m'avoir aidé et encouragé tout au long mon parcours.

A mes chères cousines : Ouarda, Ferial, Nissa, Hind, Nardjess, Besma sans oublier mes coquettes Jiji, Rawnouka et Batoul.

Specialement Injil et Bahia je vous remercier infiniment pour le soutien morale dans les moments les plus hostiles dans ma vie.

A mes chers cousins : Larbi, Badro, Sidou, Wassim, Saïd et Mahdi.

A mes chères amies : Raounek, Houda, Dounia et Souheila.

A mon confident Mohammed abdedeldjalil je vous remercier énormément de croire en moi et de me soutenir. Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

Je termine avec la personne qui a partagé avec moi la peine de préparer ce travail et qui a supporté mon humeur au moment de stresse, A mon binôme Raounek et à toute sa famille Belbekri, je vous dédie ce travail. Que Dieu vous préserve une longue vie heureuse.



Ines

Résumé

Le choléra est une maladie diarrhéique, contagieuse strictement humaine, dont l'agent pathogène est une bactérie à Gram négatif, appartenant aux sérogroupes O1 ou O139 de l'espèce *Vibrio cholerae*, c'est une cause majeure de mortalité dans le monde.

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Constantine, durant une période allant du 15/02/2020 au 19/03/2020. Elle a porté sur cinq prélèvements d'eaux usées prélevées dans Oued Rhumel, Oued Boumerzoug et dans la STEP d'Ibn Ziad. Le but de cette étude, est la recherche et l'identification des vibrions cholériques dans ces eaux. Nous avons utilisé les méthodes bactériologiques classiques, de diagnostic de la bactérie. Ces méthodes reposent sur l'enrichissement, sur eau peptonée alcaline, un isolement sur milieu sélectif GNAB et une identification par des caractères biochimiques.

Les principaux résultats de notre travail de recherche, ont révélé la présence de deux souches de *Vibrio*, réparties successivement dans Oued Boumerzoug (B) et Oued Rhumel (C), qui se sont avérées des (NAG). On note également, une sensibilité de ces souches de *Vibrio* à la Colistine. Nos résultats ont aussi révélé, la présence d'une troisième souche, dans la STEP d'Ibn Ziad (E), qui appartient au genre *Aeromonas* et qu'on la rapproche de l'espèce *A. hydrophila*.

Mots clés : Choléra, *Vibrio cholerae*, eaux usées, Oued Rhumel, Oued Boumerzoug, STEP d'Ibn Ziad, méthodes bactériologiques.

ملخص

الكوليرا مرض مسبب للإسهال معد خاص بالإنسان، العامل المعدي هو بكتيريا سالبة الغرام تنتمي الى المجموعتين المصليتين 01 او 0139 للنوع *Vibrio cholerae*، وهو سبب اساسي للموت عالميا

دراستنا تمت في مخبر النظافة لولاية قسنطينة خلال الفترة الممتدة بين 2020/02/15 و 2020/03/19. حيث تمت على خمس عينات لمياه الصرف الصحي مأخوذة من واد الرمال، واد بومرزوق و محطة التنقية بابن زياد. الهدف من الدراسة هو البحث و التعرف على عصيات الكوليرا في هذه المياه. استعملنا الطرق البكتريولوجية الكلاسيكية لتشخيص البكتيريا. هذه الطرق اعتمدت على الإغناء في الماء البيتوني القاعدي، العزل في وسط مغذي انتقائي GNAB و التعرف عن طريق خصائص بيوكيميائية.

النتائج الاساسية لبحثنا كشفت عن وجود سلالتين من *Vibrio*، تنتمي بالتوالي الى واد بومرزوق (B) و واد الرمال (C) و التي تبين انهما (NAG). سجلنا أيضا حساسية هاته السلالتين للكوليستين. نتائجنا أظهرت أيضا وجود سلالة ثالثة من محطة ابن زياد (E) و التي تنتمي الى جنس *Aeromonas* و المقربة لنوع *A. hydrophila*.

الكلمات المفتاحية : كوليرا، *Vibrio cholerae*، مياه الصرف الصحي ، واد بومرزوق، واد الرمال، محطة التنقية ابن زياد، طرق بكتريولوجية.

Abstract

Cholera, strictly contagious to humans, whose pathogen is a Gram-negative bacterium belonging to the serogroups O1 or O139 of the *Vibrio cholerae* species, is a diarrheal disease. It is a major cause of mortality worldwide.

Our study was carried out at the level of the hygiene laboratory of the Wilaya of Constantine during a period going from 15/02/2020 to 19/03/2020. It covered five samples of waste water taken in Oued Rhumel, Oued Boumerzoug and in the STEP of Ibn Ziad. The aim of this study is the search and identification of *Vibrio cholerae* in this water. We used the classical bacteriological methods of diagnosis of the bacterium. These methods are based on enrichment on alkaline peptone water, isolation on selective medium GNAB and identification by biochemical characters.

The main results of our research work have revealed the presence of two strains of *Vibrio*, distributed successively in Oued Boumerzoug (B) and Oued Rhumel (C) which were found to be (NAG). We also noted a sensitivity of these *Vibrio* strains to Colistin. Our results also revealed the presence of a third strain in the STEP of Ibn Ziad (E), which belongs to the genus *Aeromonas* and is related to the species *A. hydrophila*.

Key words: Cholera, *Vibrio cholerae*, waste water, Oued Rhumel, Oued Boumerzoug, STEP of Ibn Ziad, bacteriological methods.

Table des matières

Introduction	1
Etude Bibliographique	
I. Les eaux usées	2
1. Définition des eaux usées	2
2. Station d'épuration	2
3. Maladies à transmission hydrique	3
II. Le vibrion cholérique	5
A. Etude bactériologique	5
1. Historique	5
1.1 Traces antiques.....	5
1.2 Ere classique	5
1.3 Ere moderne	5
2. Ecologie.....	6
3. Taxonomie	6
4. Caractères bactériologiques.....	8
4.1 Caractères morphologiques.....	8
4.2 Caractères cultureux.....	9
4.3 Caractères biochimiques	10
4.4 Caractères antigéniques.....	12
4.5 Caractères génétiques.....	13
5. Identification de <i>Vibrio cholerae</i>	13
6. Pouvoir pathogène et la virulence	16
6.1 Pouvoir pathogène.....	16
6.2 Virulence	18
B. Etude épidémiologique	21
1. Transmission.....	21
1.1 Voix hydrique	21
1.2 Voix interhumaine.....	21
2. Epidémiologie.....	22
2.1 Dans le monde.....	22
2.2 En Afrique.....	23

2.3	En Algérie	23
2.4	A Constantine.....	23
3.	Facteurs favorisant l'épidémie du choléra	25
3.1	Facteurs socio-démographiques	25
3.2	Facteurs sanitaires	25
3.3	Facteurs environnementaux	25
C.	Etude thérapeutique	26
1.	Traitement curatif	26
2.	Traitement préventif	28
2.1	Vaccination	28
2.2	Prophylaxie	29

Matériel et Méthodes

1.	Prélèvement	30
1.1	Présentation de la zone d'étude	31
1.2	Pratiques de prélèvement	32
1.3	Transport des échantillons.....	33
2.	Enrichissement	34
3.	Isolement	34
4.	Identification morphologique	35
4.1	Examen macroscopique	35
4.2	Examen microscopique	35
5.	Identification biochimique.....	36
5.1	Etude du type respiratoire	36
5.1.1	Recherche de l'oxydase	36
5.1.2	Recherche de la catalase	36
5.2	Etude du métabolisme glucidique	36
5.2.1	Fermentation des sucres.....	37
5.2.2	Mannitol-Mobilité.....	37
5.2.3	Utilisation du Citrate.....	37
5.2.4	Recherche de la β -galactosidase	37
5.3	Etude du métabolisme protéique.....	38
5.3.1	Recherche des enzymes de décarboxylase.....	38

5.3.2	Milieu Urée-indole.....	39
6.	Teste d'agglutination.....	39
7.	Antibiogramme.....	39

Résultats et discussion

1.	Enrichissement	41
2.	Identification morphologique	42
2.1	Identification macroscopique.....	42
2.2	Identification microscopique.....	42
3.	Identification biochimique.....	43
3.1	Test de l'oxydase	45
3.2	Test de la catalase.....	46
3.3	Milieux TSI.....	46
3.4	Test du mannitol-mobilité.....	46
3.5	Utilisation du Citrate.....	47
3.6	Recherche de la β -galactosidase	47
3.7	Recherche des décarboxylases.....	47
3.8	Milieu Urée-Indole.....	48
4.	Antibiogramme.....	48
Conclusion.....		52
Références bibliographiques.....		54

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

A. hydrophila : *Aeromonas hydrophila*

CT : Toxine Cholérique

CTXΦ : Cholera Toxin phage

EPA : Eau Péptonée Alcaline

EPA 10×c : Eau Péptonée Alcaline 10 fois Concentré

GM1 : Molécule de Ganglioside 1

GNAB : Gélose Nutritive Alcaline Bilié

HLYA : Toxine Hémolysine

H₂S : Sulfure d'Hydrogène

IV : Voie Intraveineuse

LDC : Lysine Décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharide

MH : Muller-Hinton

MTH : Maladie a Transmission Hydrique

NaCl : Chlorure de Sodium

NAG : Non Agglutinant

NAG-ST : Entérotoxine Thermostable

NNCLS : Comité National des Normes pour Laboratoires Cliniques

ODC : Ornithine Décarboxylase

OMS : Organisation Mondial de la Santé

ONP : Orthonitrophenol

ONPG : Orthonitrophényl- β -D-galactopyrannoside

OX : Test d'Oxydase

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel d'hydrogène

R : Résistance

RL : Ringer lactate

S : Sensibilité

SRO : Solutés de Réhydratation Orale

STEP : Station d'Épuration des Eaux Usées

T : Témoin

TCBS : Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose

TCP : Toxin Coregulated Pilus

TL : Taux de Létalité

TSI : Triple Sugar Iron Agar

UNICEF : United Nations of International Children's Emergency Fund

V. cholerae : *Vibrio cholerae*

VNC : Vibrion Non Cholérique

VPI : Vibrio Pathogenicity Island

Liste de figure

Figure 01 : Coloration de Gram de <i>V. cholerae</i>	9
Figure 02 : Observation microscopique des formes de <i>Vibrio</i> en « S » (A), longue (B), sphérique (C) et semi circulaire (D).....	9
Figure 03 : Aspect des colonies d'une culture de <i>V. cholerae</i> sur milieu GNAB (A) et sur milieu TCBS (B).	10
Figure 04 : Diagramme illustrant les sérogroupes, les biotypes et les sérotypes de <i>V. cholerae</i>	15
Figure 05 : Protocole de la mise en évidence du vibriion cholérique dans les eaux	16
Figure 06 : Pathogénèse du choléra et action des toxines cholériques.....	19
Figure 07 : Le schéma des voies de transmission féco-orale « f diagram »	22
Figure 08 : Répartition géographique du choléra dans le monde selon l'OMS en 2018....	24
Figure 09 : Lieu des prélèvements des eaux usées de Oued Boumerzoug (A) et (C), Oued Rhumel (B) et (D) et la STEP d'Ibn Ziad (E).....	30
Figure 10 : Carte géographique de la localisation de la STEP d'Ibn Ziad	31
Figure 11 : Carte géographique de la localisation de Oued Rhumel et Boumerzoug de Constantine	32
Figure 12 : Flacon de 500 ml contenant l'eau usée et le milieu de transport (EPA 10×c). 34	
Figure 13 : Photographie représentant la technique de lutage de la lamelle.	35
Figure 14 : Schéma de la procédure d'identification de <i>V. cholerae</i> dans les échantillons d'eaux usées.....	40
Figure 15 : Résultats de l'enrichissement dans l'EPA.	41
Figure 16 : Photographie représentant l'aspect macroscopique des colonies suspectes sur milieu GNAB.....	42
Figure 17 : Photographie d'une observation microscopique d'un isolat suspect après une coloration de Gram (objectif x 100).	43
Figure 18 : Photographie d'une observation microscopique d'un état frais.....	43
Figure 19 : Photographie du résultat de la galerie biochimique classique de la souche 1. 44	
Figure 20 : Photographie du résultat de la galerie biochimique classique de la souche 2. 44	
Figure 21 : Photographie du résultat de la galerie biochimique classique de la souche 3. 44	
Figure 22 : Résultats du test d'oxydase.	45
Figure 23 : Résultat du test de la catalase.....	46
Figure 24 : Résultat de l'antibiogramme des souches 1 et 2.	48

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de <i>V. cholerae</i> dans le monde bactérien.....	7
Tableau 02 : Caractères différentiels des genres de la famille des <i>Vibrionaceae</i>	7
Tableau 03 : Caractères biochimiques pour l'identification des espèces du genre <i>Vibrio</i>	11
Tableau 04 : Vibrions cholériques (O1 et O139) et les principaux vibrions non cholériques	12
Tableau 05 : Recherche des signes de déshydratation chez le diarrhéique.....	26
Tableau 06 : Le traitement de choléra déclaré par l'OMS	27
Tableau 07 : Les différents vaccins oraux de choléra	29
Tableau 08 : Fiche de suivi des prélèvements par échantillon.	33
Tableau 09 : Résultats de la recherche des <i>V. cholerae</i> dans l'eau usée de Oued Boumerzoug, Oued Rhumel et la STEP d'Iben Ziad.	41
Tableau 10 : Résultats des galeries biochimiques d'identification des 3 souches suspectes.	45
Tableau 11 : Profil de sensibilité des souches 1 et 2 vis-à-vis des antibiotiques testées. ..	49

Introduction

Les eaux usées sont fortement chargées en polluants et en contaminants divers, ce qui engendre un problème de risque sanitaire. La composition de ces eaux est extrêmement variable, principalement par des microorganismes pathogènes. Ces derniers ont des effets divers sur la santé, ils causent des infections bénignes, comme les gastro-entérites et les maladies mortelles comme le choléra (**Baumont *et al.*, 2004**). L'OMS estime que, l'eau usée est à l'origine de 9,1 % des maladies et de 6 % des décès enregistrés chaque année dans le monde (**Aubry et Gaüzère, 2012**).

Le choléra est une maladie infectieuse, redoutable, mortelle, la plus foudroyante. Elle constitue une menace et un problème de santé publique. Elle a été la première maladie pestilentielle à faire l'objet, dès le XIX^{ème} siècle, d'une surveillance internationale. Ce fléau garde jusqu'aujourd'hui sa modernité et continue à faire des ravages. Cependant l'Algérie a connu une petite épidémie passagère en 2018 à Alger. L'OMS estime que le bilan véritable de la maladie est de 1,3 à 4 millions de cas et de 21 000 à 143 000 décès recensés chaque année dans le monde (**Bompangue Nkoko, 2009 ; Audry et Gaüzère, 2020**).

Le choléra, maladie de la peur bleue est à l'origine d'un agent pathogène, connu sous le nom de *V. cholerae*. Cette bactérie fût initialement observée par Filippo Pacini en 1854, puis isolée en 1883 par le médecin et bactériologiste allemand Robert Koch en Egypte. C'est un bacille à Gram négatif d'une morphologie en virgule (**Dunoyer, 2013 ; Quilici, 2011**).

L'objectif de notre travail est la recherche de *V. cholerae* dans les eaux usées, afin de pouvoir les isoler, puis les identifier et ainsi apprendre la méthode de diagnostic de la bactérie et estimer le degré de contamination des eaux usées.

L'ampleur du choléra au niveau national et international, nous a motivé à l'étudier, à connaître son histoire, son agent responsable, et comment peut-on le mettre en évidence. De ce fait notre travail se divise en deux parties :

- Une partie théorique, qui comporte des généralités sur les eaux usées et des généralités sur le vibron cholérique d'où, une étude bactériologique, une étude épidémiologique et une étude thérapeutique.
- Une partie pratique, qui a pour but de rechercher le choléra dans différents échantillons d'eaux usées, selon les étapes suivantes : prélèvement, enrichissement, isolement, identification morphologique qui comprend, une étude macroscopique et microscopique et enfin une identification biochimique.

Etude Bibliographique

I. Les eaux usées

1. Définition des eaux usées

L'eau est une ressource naturelle, un élément moteur, un besoin indispensable et un composant primordial de la vie humaine, de la faune et de la flore. Cependant, elle peut nuire à la santé des individus en causant des maladies graves, si cette dernière n'est pas traitée. Les problèmes de santé relatifs à l'eau sont devenus de plus en plus nombreux. En effet cette ressource est considérée, comme la première cause de mortalité au monde.

Les eaux usées demeurent une ressource sous-estimée, bien souvent perçues comme un fardeau à éliminer. Elles sont définies comme étant un effluent pollué jeté dans un émissaire d'égouts ou canalisations d'assainissement. Elles sont constituées, d'eaux issues, des activités domestiques, agricoles et industrielles, englobant également, les eaux de pluies. Ces eaux usées résultent de la pollution physico-chimique et bactériologique (**Baumont *et al.*, 2004**).

2. Station d'épuration

La station d'épuration (STEP), est une usine de traitement des eaux usées, dans laquelle ces eaux subissent un ensemble de techniques et d'étapes de traitement afin de les purifier et ensuite les rejeter, sans dommage dans le milieu naturel et rejoindront alors le cycle de l'eau (**Adour *et al.*, 2018**).

Les eaux usées de la ville de Constantine subissent au niveau de la STEP d'Ibn Ziad des prétraitements (dégrillage, dessablage, déshuilage) suivie par des traitements biologiques et physiques.

○ Prétraitements

Ces traitements dits aussi préliminaires, ont pour but l'extraction des matières les plus grosses (plastiques, feuilles, tissus...) et des éléments susceptibles de gêner les étapes ultérieures du processus (**Banouh et Djenane, 2017**) ils comprennent :

- Le dégrillage qui permet d'éliminer les corps flottants et les gros déchets par l'intermédiaire de grilles placées à travers un canal, afin de protéger les installations contre les obstructions (**Alexandre *et al.*, 1998**).

- Le dessablage qui permet de débarrasser l'eau des matières qui n'ont pas été retenues par le dégrillage (sable, gravier...), afin de protéger les conduites et les pompes contre l'abrasion. Ces particules récupérés sont essorés, puis lavés avant d'être soit envoyés en décharge, soit réutilisés, selon la qualité du lavage (**Génard, 2003**).

- Déshuilage qui consiste à éliminer les graisses dans un bassin. Les produits récupérés sont évacués en vue d'un traitement de boues, les eaux sont alors évacuées et continuent leurs assainissements dans la STEP (**Banouh et Djenane, 2017**).

- **Traitement biologique**

La lutte biologique est essentiellement utilisée pour les traitements des eaux usées d'origine organique, en particulier le traitement de la pollution urbaine (**Ghizellaoui, 2010**).

Dans la STEP d'Ibn Ziad, le processus biologique le plus utilisé est les boues activées. Ces boues sont chargées par des bactéries, qui exigent un apport permanent d'oxygène, pour la consommation de la matière organique biodégradable et la réduction de la concentration des boues résidus dans l'eau à traiter (**Mouffok, 2008**).

- **Traitement physique**

- **Clarification et rejet des effluents**

A l'issue des traitements, une ultime décantation permet de séparer l'eau épurée et les boues résidus secondaire issus de la dégradation des matières organiques. Cette décantation est opérée dans des bassins spéciaux appelés « clarificateur » (**Génard, 2003**). Une fois traitées, les eaux sont évacuées par le canal de sortie, pour rejoindre leur milieu récepteur qui est Oued Rhumel.

3. Maladies à transmission hydrique

Chaque année des milliers de personnes dans le monde perdent leur vie à cause des maladies liées à l'eau. Selon L'OMS et L'UNICEF plus d'un milliard d'individus n'ont pas accès à une eau potable sûre. Le processus d'apparition des MTH est dû à une pollution causée par des microorganismes pathogènes (les bactéries, les protozoaires et les virus), rejetés par les matières fécales dans les eaux usées. Citons parmi ces microorganismes : les *Salmonella*, *E.coli*, *Vibrio cholerae*, *Entamoeba histolytica*, les helminthes, rotavirus (**Hacene, 2016**).

Le choléra, la fièvre typhoïde, les dysenteries et l'hépatite virale de type A, représentent les principales maladies à transmission hydrique en Algérie. Ces dernières, malheureusement continuent à faire des ravages dans les pays en développement, dont le principal véhicule et l'origine de toute épidémie est l'eau usée. En effet ces maladies à transmission hydrique sont en termes de morbidité, les premières maladies à déclaration obligatoire notifiées au Ministère de la santé (**Kherifi et Bekiri, 2017**).

Le ministère de la Santé et de la population, a mis en place un comité national de lutte contre les MTH et la prévention de leur apparition, dont le rôle consiste à un traitement régulier des eaux distribuées à la population, en utilisant des filtres antibactériens et anti-résidus dans les conduites, des dispositifs pour la désinfection des puits, comme les galets de chlore, en outre la désinfection et le nettoyage des réservoirs de stockage, afin d'améliorer la qualité de l'eau. Cette lutte porte également sur le contrôle, la sensibilisation, la surveillance et l'hygiène (**Raoui, 2019**).

II. Le vibrion cholérique

A. Etude bactériologique

1. Historique

Le choléra est une maladie ancienne, mais elle est encore aujourd'hui considérée comme un grave problème de santé publique, dans de nombreuses régions du monde. Son histoire a connu trois phases principales :

1.1 Traces antiques

Le choléra semble exister depuis plus de deux millénaires. Cette maladie ancestrale est connue depuis l'antiquité Grecque. Son étymologie la plus probable signifie en grec ancien « écoulement de bile » (**Janny, 2004**).

1.2 Ere classique

Le choléra a été déclaré dans le fleuve Delta du Gange de l'Inde (actuellement le Bangladesh) en 1783, qui a fait 20 000 victimes, en moins de huit jours. C'est une période durant laquelle le choléra n'a atteint presque exclusivement que l'Inde.

Rogers et Megaw (1952) ont affirmé que les pèlerins qui ont visité l'Inde tant que pays de pèlerinage et de lieu saint, sont responsables de l'apparition du choléra, notamment sa dissémination sur de vastes étendues.

Cette ère a connu six pandémies, qui ont frappé le monde par vagues successives de 1817 à 1960 et qui ont causé, la mort de millions de personnes. Le choléra s'est propagé de son foyer l'Inde vers d'autres continents, à savoir l'Europe, l'Amérique et l'Afrique. Cette amplitude rapide est favorisée par les guerres, ainsi que l'amélioration des moyens de transports maritimes qui a marqué le XV^{ème} et XVI^{ème} siècle (**Pollitzer, 1960**).

1.3 Ere moderne

Les flambées dévastatrices qu'a connues l'humanité, s'achèvent par une septième pandémie cholérique, qui sévit depuis les années 1960 dans le monde, en particulier dans les pays en développement.

Cette vague pandémique, commence en Asie orientale, en 1962 et atteint l'Afrique en 1971 pour terminer à Madagascar en 1999. Aujourd'hui, le continent Africain est celui qui paye le plus lourd tribut de la maladie (**Audry et Gaüzère, 2020**).

2. Ecologie

La plupart des espèces de *Vibrio* sont ubiquitaires dans les environnements marins. Elles vivent en saprophyte dans les eaux salées (eau de mer, eau saumâtre et les estuaires) ainsi que, dans les eaux douces (fleuves). Ces bactéries vivent dans un milieu humide et peuvent survivre sous une forme libre ou en association avec des planctons (phytoplanctons ou zooplanctons), des supports, sédiments, particules en suspension, et dans certains cas, quand les conditions sont défavorables, elles se présentent sous une forme viable non cultivable (Daoudi, 2017 ; Vezzulli *et al.*, 2010).

Son écologie est grandement dépendante de la température, la salinité, le pH et les potentialités nutritionnelles du milieu. Ce *Vibrio* peut survivre, 1 à 2 ans dans les eaux côtières chaudes et les estuaires, quelques heures sur surfaces sèches et entre 1 et 7 jours sur des objets solides (ustensiles, vêtements, pièces de monnaie). Il peut ainsi survivre de 1 à 14 jours dans les aliments, à température ambiante et de 1 à 35 jours à une température de glacière. Il résiste également au froid pendant quelques jours entre 5 et 10°C. En revanche, cette bactérie ne peut pas survivre dans un environnement acide. Elle est sensible à l'eau de Javel 1 %, l'éthanol à 70 %, l'acide peracétique à 2 % et également à la dessiccation et les températures au-dessus de 70°C (Melin, 2018 ; UNICEF, 2013).

Les vibrions non cholériques, incluant les souches de *V. cholerae* non O1 et non O139, n'ont qu'un réservoir, le réservoir environnemental. Elles représentent un composant de la flore autochtone et appartiennent à l'écosystème marin et estuarien. Ces bactéries sont plus abondantes dans les mois chauds de l'été. Leur présence dans l'environnement marin est indépendante de la présence de souche de *V. cholerae* (EL Marrakchi, 2012).

3. Taxonomie

La classification des vibrions cholériques repose, sur la taxonomie phénotypique, numérique et phylogénétique, ce qui permet de les regrouper en taxon afin de les identifier et de les classer. Et ceci à partir des caractéristiques communes que regroupent diverses souches (Labreuche, 2006).

La famille des *Vibrionaceae*, a fait l'objet d'études approfondies dans le Manuel de Bergey, elle a été décrite pour la première fois par Véron en 1965. Cette famille réside au sein des Gammaproteobacteria, des cinq subdivisions du phylum Proteobacteria au sein du domaine Bacteria (tableau 01). Par ailleurs Véron a distingué les particularités de cette

famille par rapport à celle des *Enterobacteriaceae*, en relevant une certaine sensibilité de ses membranes à l'agent vibriostatique O129 ainsi que la présence d'une cytochrome oxydase. Cette famille comporte quatre genres principaux *Vibrio*, *Photobacterium*, *Plesiomonas* et *Aeromonas* (tableau 02). Les espèces de ces deux derniers genres, sont responsables de diarrhées et d'infections septicémiques chez l'Homme (**Nishiguchi et Jones, 2004 ; Farmer et Janda, 2015 ; Bonhomme, 2003**).

Tableau 01 : Classification de *V. cholerae* dans le monde bactérien (**Gay, 2004**).

DOMAINE	BACTERIA
PHYLUM	PROTEO BACTERIA
CLASSE	GAMMA PROTEOBACTERIA
ORDRE	VIBRIONALES
FAMILLE	VIBRIONACEA
GENRE	<i>VIBRIO</i>
ESPECE	<i>Vibrio cholerae</i>

Tableau 02 : Caractères différentiels des genres de la famille des *Vibrionaceae* (**Bonhomme, 2003**).

propriétés	<i>Vibrio</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Aeromonas</i>
p.100 molaire Guanine + cytosine	38-51	40 – 44	51	57-63
Sensibilité à l'agent O129	+	+	+	-
Fermentation du D-mannitol	+	-	-	+
Nécessite l'ion Na ⁺ pour la croissance ou stimuler la croissance	+	+	-	-

Selon le Manuel de Bergey, les espèces du genre *Vibrio* ont passé de 5 en 1974 à 72 en 2002 (**Nishiguchi et Jones, 2004**) puis à 90 en 2011 (**EL Marrakchi, 2012**). Chaque année leurs nombres augmentent avec les nouvelles découvertes, issues des recherches effectuées dans le domaine de la taxonomie. Parmi ces espèces, certaines sont pathogènes et à l'origine des plus grands risques en termes de santé publique, notamment *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* et d'autres sont non pathogènes comme *V. aerogenes* (**Guegan, 2006**).

4. Caractères bactériologiques

4.1 Caractères morphologiques

Le genre *Vibrio* a certaines caractéristiques en commun, cités dans le Manuel de Bergey comme suit : « cellules courtes, incurvées, isolées ou réunies en spirales. Mobiles grâce à un flagelle polaire unique, qui est habituellement court : exceptionnellement, deux ou trois flagelles en touffes ».

V. cholerae, apparait sous microscope sous forme, de bacilles à Gram négatif incurvé, à bout rond ayant l'aspect d'une virgule, de 1.5 à 2.4 μm de long sur 0.3 à 0.4 μm de large (figure 01). Cependant et suite à une prolongation du temps de culture, *Vibrio* apparait sous différentes formes, d'où le pléomorphisme. Il peut être plus court (d'une courbure marquée) ou plus long (faiblement incurvé). On peut même trouver occasionnellement l'aspect de la lettre « S », une forme sphérique ou encore en forme semi-circulaire (figure 02). Ces formes caractéristiques des vieilles cultures, résultent de l'adhérence de deux *Vibrio* précisément, les formes longues et l'aspect en « S » (**Pollitzer, 1960**).

Les bactéries du genre *Vibrio* sont très mobiles, grâce à un flagelle polaire monotriche qui est plus long que le corps, et peut atteindre le double de celui-ci, soit 3 μm . Il s'implante directement dans le cytoplasme en traversant la paroi, notamment chez *V. cholerae*. D'autres espèces présentent des flagelles latéraux péritriches. Les bactéries de ce genre ne forment pas d'endospores ni de microcystes (**Fouche, 1993 ; Gallut et Giuntini, 1963**).



Figure 01 : Coloration de Gram de *V. cholerae* (Géo *et al.*, 2012).

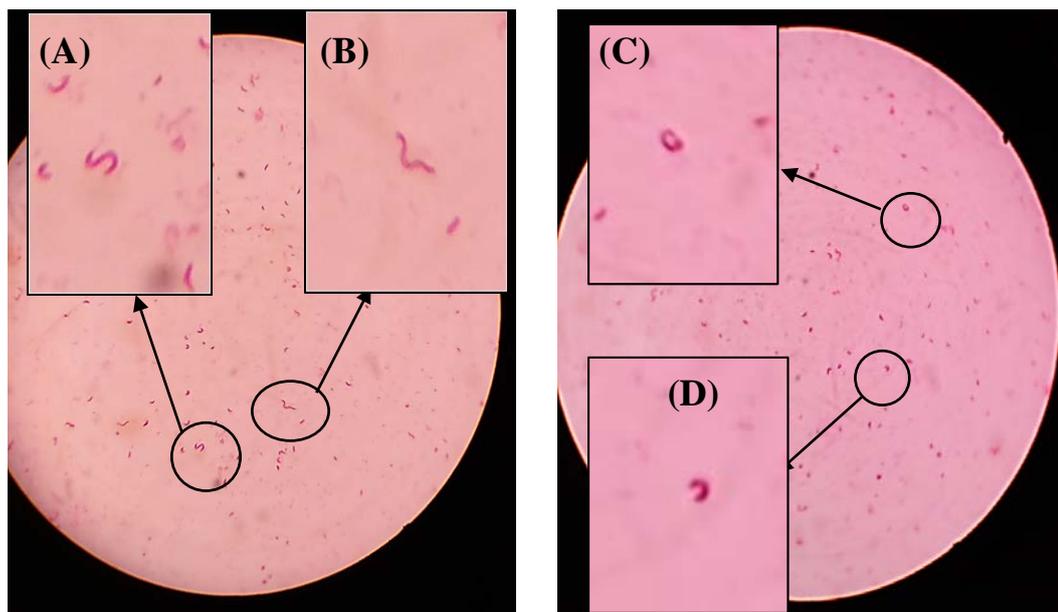


Figure 02 : Observation microscopique des formes de *Vibrio* en « S » (A), longue (B), sphérique (C) et semi circulaire (D). Photographie prise le 16/03/2020 au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Constantine (R. Belbekri).

4.2 Caractères cultureux

Les espèces de *Vibrio* sont en général halophiles (vibrions non cholériques), mais certaines sont halotolérantes notamment *V. cholerae*. Cette bactérie présente une tolérance de 3 à 6 % au NaCl, mais également elle peut croître en absence de sel et sa croissance optimale est observée à des concentrations de 1 à 3 % de NaCl (Delarras, 2014).

Pour une culture du *V. cholerae*, il faut également porter l'attention sur le pH et la température. Il se cultive à des pH, compris entre 6 et 11, soit un pH optimal de 7.5 – 8. La plupart, des *Vibrio* croît à des températures allant de 30 à 40°C et avec une température

optimale de 37°C. En effet *V. cholerae* pousse sur la gélose nutritive biliée alcaline (GNAB), ou encore sur la gélose au thiosulfate citrate bile saccharose (TCBS), qui sont des milieux sélectifs pour les vibrions, sachant que ces derniers résistent à la bile et aux sels biliars. Cette bactérie pousse aussi, abondamment en milieu peptoné simple concentration 1 % de NaCl. Les colonies suspectes sur GNAB sous forme de colonies rondes, bleutées, transparentes, à bords réguliers d'un diamètre de 2 mm. Par contre celles obtenues sur TCBS sont arrondies, bombées et jaunes (figure 03) (Daoudi, 2017).

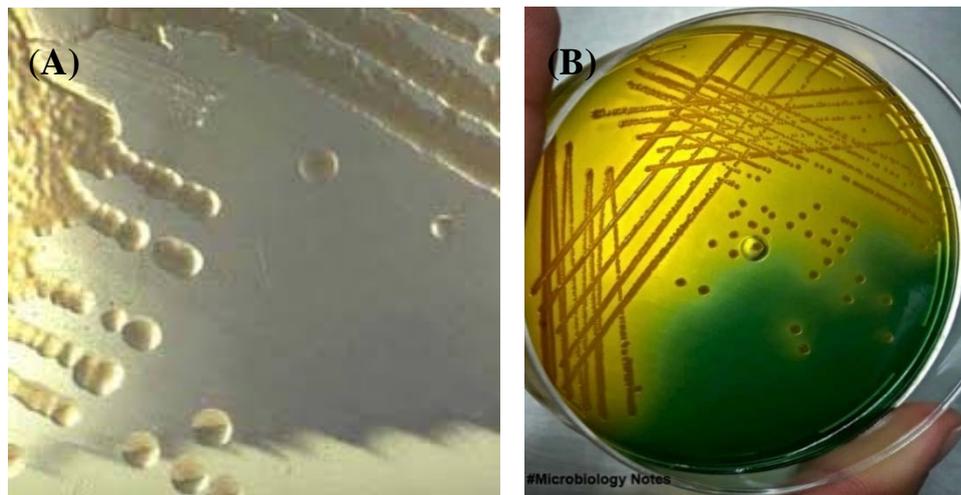


Figure 03 : Aspect des colonies d'une culture de *V. cholerae* sur milieu GNAB¹ (A) et sur milieu TCBS² (B).

4.3 Caractères biochimiques

Les propriétés biochimiques, sont les caractères essentiels et conventionnels dans l'identification des vibrions cholériques. C'est un ensemble de tests qui étudient le métabolisme protéique, la fermentation des sucres, la présence d'enzymes etc. L'activité métabolique du *V. cholerae* est à la fois oxydative et fermentative. Cette bactérie, se développe en condition aéro-anaérobie, elle est capable de produire une oxydase ainsi qu'une catalase et également fermente le glucose, sans production de gaz ni d'H₂S. *V. cholerae* produit certaines enzymes métabolique telles que l'ornithine décarboxylase

¹ <http://www.microbes-edu.org/professionel/diag/vibiro.html>

² <https://microbenotes.com/vibrio-cholerae-owaga-on-tcbs-agar/>

(ODC), la lysine décarboxylase (LDC), mais elle ne produit pas l'argénine dihydrolase (ADH) et l'uréase (tableau 03) (**Berche, 2003**).

Tableau 03 : Caractères biochimiques pour l'identification des espèces du genre *Vibrio* (**Dupeyron, 1997**).

	<i>V cholerae O1 ou non O1</i>	<i>V mimicus</i>	<i>V metschnikouii</i>	<i>V hollisae</i>	<i>V damsela</i>	<i>V fluvialis</i>	<i>V fumissii</i>	<i>V vulnificus</i>	<i>V alginolyticus</i>	<i>V parahaemolyticus</i>	<i>V cincinnatiensis</i>	<i>V carchariae</i>
Oxydase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	V	-	-	V	V	V	-	-	V	-
Nitrate réductase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance en absence de NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance en présence de 1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine décarboxylase	+	+	V	-	V	-	-	+	+	+	V	+
Ornithine décarboxylase	+	+	-	-	-	-	-	V	V	+	V	-
Arginine dihydrolase	-	-	V	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-
Indole	+	+	V	+	-	V	V	+	V	+	-	+
VP	V	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	V
Gaze en glucose	-	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	-	-	+	+	V	+	+	+	V
saccharose	+	-	+	-	-	+	+	V	+	-	+	V
Arabinose	-	-	-	+	-	+	+	-	-	v	+	-

+ : positif pour 90 à 100 % des souches

- : négatif pour 90 à 100 % des souches

V : variable suivant les souches

4.4 Caractères antigéniques

V. cholerae présente une grande diversité au niveau de sa couverture antigénique. Elle possède au niveau de sa membrane externe des antigènes : un antigène flagellaire H thermolabile, un antigène capsulaire K et un antigène somatique O thermostable.

L'antigène somatique O, est d'une importance capitale, car sa spécificité immunologique va permettre de décrire plus de 200 sérogroupes au sein de cette même espèce et de faire la distinction entre les vibrions cholériques et les non cholériques (tableau 04) (Morillon et Garnotel, 2004).

L'antigène flagellaire H, est commun chez tous les vibrions (cholériques ou non cholériques), il a un rôle facultatif uniquement chez les vibrions mobiles (Fouche, 1993).

L'antigène capsulaire K, est présent surtout chez les Sérogroupes O139 comparativement aux autres souches de *V. cholerae* (Quilici, 2011).

Tableau 04 : Vibrions cholériques (O1 et O139) et les principaux vibrions non cholériques (Fournier et Quilici, 2007).

Espèce	Classement selon l'antigène O ¹	Classement selon le biotype ²	Pouvoir pathogène
Vibrions cholériques			
<i>Vibrio cholerae</i>	Sérogroupe O1	Classique El Tor	Responsable des 5 ^{ème} et 6 ^{ème} pandémie. Responsable de la 7 ^{ème} pandémie.
	Sérogroupe O139	Non décrit	Responsable d'une 8 ^{ème} pandémie.
Vibrions non cholériques	Sérogroupe non O1		Gastro entérite
	Sérogroupe non O139		Suppuration
	Plus de 200 Sérogruppe		Septicémie

¹Déterminé selon la réactivité immunologique de la partie polysaccharidique du lipopolysaccharide

²Déterminé selon des caractères biochimiques et la production d'une hémolysine.

4.5 Caractères génétiques

Les *Vibrionaceae* présentent une structure chromosomique complexe, composée de deux chromosomes circulaires. En effet, le génome de *V. cholerae* est composé d'un premier chromosome de grande taille conservé (2.96 Mb), qui contient la majorité des gènes essentiels codant pour les fonctions cellulaires, des gènes impliqués dans la réplication, la transcription, la traduction et la biosynthèse. Ainsi, les gènes intervenant dans la pathogénicité et la plupart des gènes de croissance. Et d'un deuxième chromosome de petite taille variable (1.07 Mb), qui contient une grande proportion de gènes hypothétiques, ainsi que des gènes d'adaptation de la bactérie aux changements environnementaux. Selon l'hypothèse de Heidelberg et coll, l'origine de ce petit chromosome est un méga-plasmide qu'un ancêtre de *Vibrionaceae*, aurait acquis et l'aurait domestiqué, en lui transférant quelques gènes essentiels du grand chromosome (Marie-Eve Val, 2008).

La capacité de *V. cholerae* à provoquer le choléra chez l'homme, dépend de la présence dans leur génome, de deux ensembles de gènes de virulence appelés îlots de pathogénicité. Ces derniers correspondent aux génomes des bactériophages appelé VPI Φ et CTX Φ (Bompangue Nkoko, 2009).

5. Identification de *Vibrio cholerae*

Il existe deux types de prélèvement pour la recherche de *V. cholerae*, soit à partir des selles et des vomissements des malades, soit à partir des eaux usées.

La détection et l'identification des vibrions, se fait selon une procédure bien déterminée (figure 05). Tout d'abord, les échantillons à analyser sont homogénéisés dans l'eau peptonée alcaline (EPA 10xc), puis incubés à 37°C pendant 6 à 18 heures. La suspension obtenue, est à son tour diluée dans de l'EPA et incubée à 37°C pendant 6 à 18 heures (Helsens, 2018).

- Sur une gélose nutritive alcaline biliée, un ensemencement est effectué à l'aide de cette suspension suivi d'une incubation à 37°C pendant 24 heures, afin de rechercher des colonies caractéristiques. Ces dernières sont utilisées pour réaliser un examen direct, afin d'analyser la mobilité de la bactérie à l'état frais, puis une coloration de Gram, ainsi qu'une réaction d'oxydase et de catalase. Ces tests permettent d'étudier les caractères cultureux, morphologiques et biochimiques de la bactérie. Une bactérie à mobilité de type polaire, qui

se déplace en vols de mouchérons, Gram négatif, et positif pour le test de l'oxydase, est fortement évocatrice d'un vibron cholérique (**Morillon et Garnotel, 2004**).

Il existe des milieux qui permettent de déterminer les caractères biochimiques de cette espèce, parmi lesquels on cite le milieu urée-indole, le milieu Kligler-hajna, le disque d'ONPG, et sur milieux en tubes pour la recherche des décarboxylases et dihydrolases ou sur une galerie API 20E (**Quilici, 2011**). L'espèce *V. cholerae* est alors :

- Sur le milieu urée-indole : indole positive (à l'exception des souches indoles négatives isolées en Afrique depuis 1993).
- Sur disque ONPG : positive.
- Sur milieux en tubes : ADH négatif, LDC positif, ODC positif.
- Sur milieu Kligler-hijna : elle utilise le glucose sans production de gaz ni de sulfure d'hydrogène (H₂S).

D'autres milieux permettent d'étudier les caractères cultureux de cette espèce comme la gélose TCBS, qui révèle la présence du saccharose. En effet *V. cholerae* croit dans un milieu sans NaCl et même en présence de NaCl 6 %. Elle croit aussi en aéro-anaérobie sur une gélose viande foie semi-solide (ce qui les différencie des *Pseudomonas*) (**Quilici, 2011**).

- Les sérogroupes O1 (biotype classique et El Tor) et O139, sont les principaux agents pathogènes qui causent des épidémies et des pandémies du choléra. Les tests d'agglutinations, permettent de caractériser les sérogroupes et les sérotypes de toutes les souches de *V. cholerae*. L'identification des sérogroupes, se fait par agglutination de ces souches avec les sérums anti-O1 et anti-O139 (**Muyldermans, 2016**).

V. cholerae O1 se divise en trois sérotypes dénommés Inaba, Ogawa et Hikojima (figure 04) et produit une agglutination en moins de deux minutes avec le sérum anti O1. Ces derniers, ont des structures antigéniques différentes et sont classés selon l'ag O et de la présence de proportions variables de déterminants nommés A, B et C. En effet, le sérotype Ogawa est le plus répandu, il contient les antigènes A et B, il est positif pour l'antisérum Ogawa. Le sérotype Inaba contient les antigènes A et C, il est positif pour l'antisérum Inaba. Et enfin, le sérotype Hikojima qui est très rare et instable dans l'environnement, c'est une forme de transition entre les deux premiers, et présente des antigènes instables A, B et C, elle est positive pour les antisérums Ogawa et Inaba (**Fournier et Quilici, 2007**).

Le sérotype O139 est identifié pour la première fois en Inde 1992, il produit une agglutination avec le sérum anti O139 mais, ne se divise ni en biotypes ni en sérotypes (**Huq et al., 1983**).

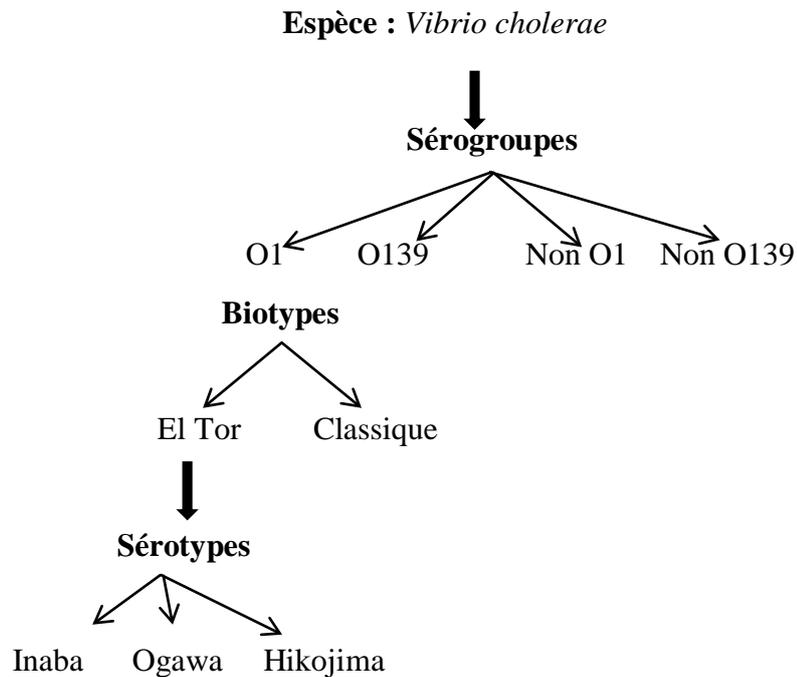


Figure 04 : Diagramme illustrant les sérogroupe, les biotypes et les sérotypes de *V. cholerae* (**Alaoui Mdaghri, 2019**).

- Un antibiogramme est réalisé par la méthode des disques, en respectant les règles du comité national des normes pour les laboratoires cliniques (NCCLS), afin d'étudier la résistance et la sensibilité de *V. cholerae* aux antibiotiques (**Gallut et Giuntini, 1963**).

Selon l'OMS cette bactérie est résistante à la Tétracycline et les sulfamides et sensible à la Doxycycline, Colistine et le Macrolide.

Enfin, l'étude des caractères culturels, morphologiques, biochimiques, sérologiques, la résistance et la sensibilité aux agents antimicrobiens, permettent d'affirmer qu'il s'agit de l'espèce *V. cholerae*.

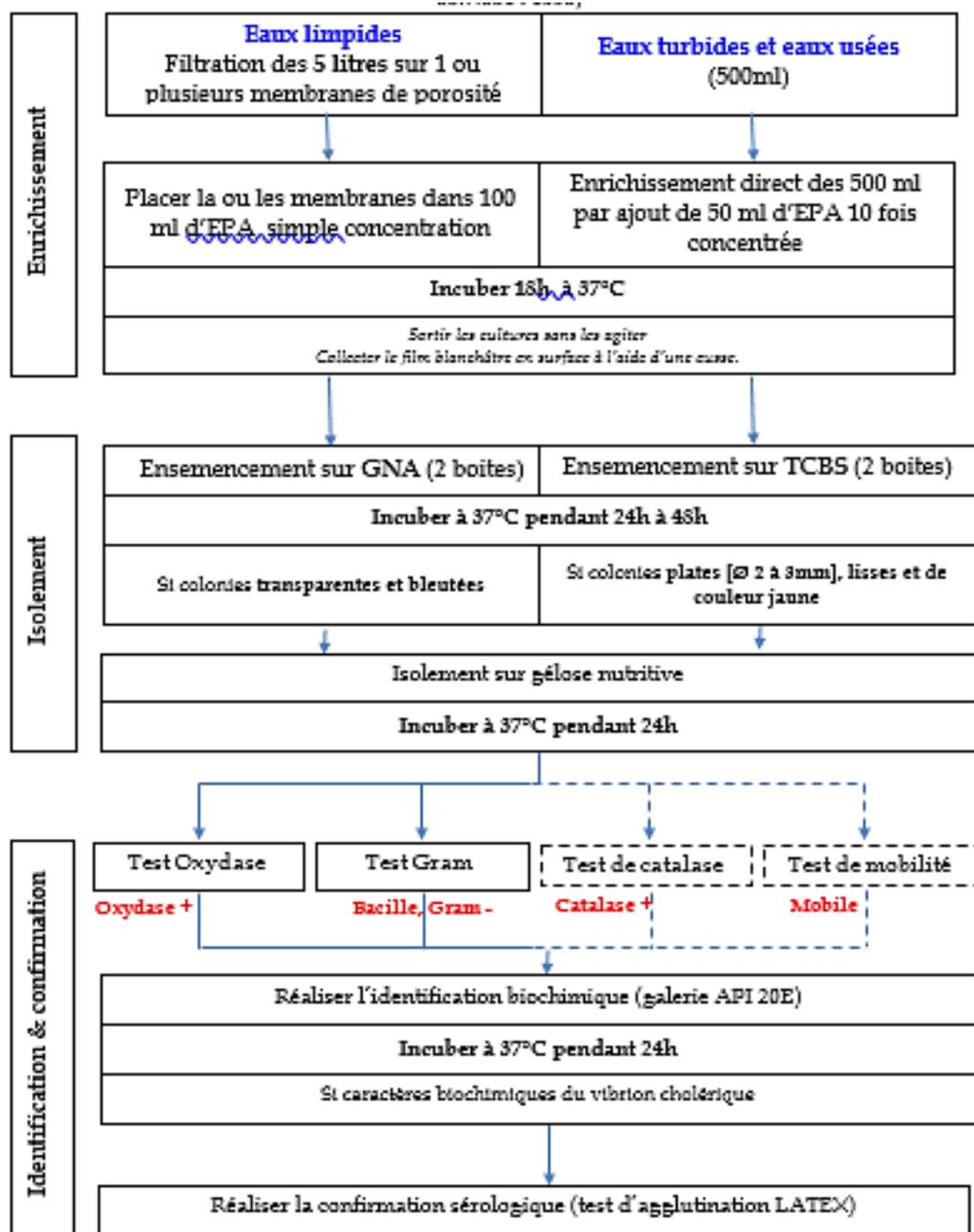


Figure 05 : Protocole de la mise en évidence du vibron cholérique dans les eaux (Alaoui Mdaghri, 2019).

6. Pouvoir pathogène et la virulence

6.1 Pouvoir pathogène

Les souches de *V. cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139, sont à l'origine d'épidémies de choléra et provoquent des diarrhées graves. En revanche, les sérogroupes autres que O1 et O139, désignés comme non O1/non O139, également appelés les vibrions

non cholériques (VNC), sont responsables d'épidémies de gastro-entérite et provoquent des diarrhées modérées ou légères (**Arteaga et al., 2020**).

- **Vibrions cholériques**

La bactérie cholérique n'est pas directement responsable de la maladie, elle adhère à la muqueuse intestinale et secrète une toxine qui en est la cause. Cette dernière, perturbe les processus cellulaires normaux d'absorption et de sécrétion de liquides et d'électrolytes (**UNICEF, 2013**).

V. cholerae est très sensible à l'acidité. L'acide chlorhydrique naturellement présent dans l'estomac, empêche les vibrions d'atteindre le duodénum où il pourra exprimer sa virulence (**Boutin et al., 2001**). Ainsi La dose infectante nécessaire pour induire la maladie, est relativement élevée 10^8 à 10^{11} bactéries. Il a été montré que l'ingestion préalable de bicarbonate de sodium, abaisse la dose à environ $10^4 - 10^6$. Cependant cette dose infectante est liée à l'état de santé de la personne et au métabolisme de son estomac (**Fournier et Quilici, 2007**).

V. cholerae peut entraîner des syndromes allant de cas asymptomatiques (environ 80 % des cas) au choléra grave (seulement 20 %) (**Dunoyer, 2013**). Cette maladie est responsable, après une période d'incubation de quelques heures à cinq jours, d'une diarrhée violente très contagieuse accompagnée de vomissements sans fièvre. Les selles cholériques sont liquides, aqueuses, non sanglantes, afécales et ont l'aspect de l'eau de riz. Ceci entraîne une perte importante d'eau et d'électrolytes qui peut aller jusqu'à 15 à 20 litres par jour, menant à une déshydratation rapide et une soif intense, ainsi que des crampes musculaires très douloureuses, un pouls rapide, un effondrement de la pression artérielle, une respiration difficile, un pli cutané persistant, une oligurie évoluant rapidement vers une anurie. Le visage du cholérique est cyanosé d'où l'expression "avoir une peur bleue". En absence de traitement, le patient cholérique évolue vers un état de grande faiblesse, puis la mort survient en un à trois jours. Comme l'a témoigné Nathalie H. infirmière spécialiste des maladies infectieuses « Le plus dur, le plus marquant, c'est leurs yeux, leurs regards enfoncés. On peut lire dans ces regards : si vous ne faites rien, je vais mourir. » (**Fournier et Quilici, 2007**). Le vibrion disparaît des selles spontanément en 7 à 14 jours (**Audry et Gaüzère, 2020**).

- **Vibrions non cholériques**

Certaines souches de *V. cholerae* ne sont pas agglutinantes avec les antisérums O1 et O139, ce sont les souches non O1 et non O139, désignées aussi comme les non agglutinant (NAG), mais elles peuvent causer des maladies diarrhéiques. Ces souches ont été principalement associés à des cas sporadiques de gastroentérite, de bactériémie et d'infections des plaies, qui sont dû à la consommation de mollusques et de crustacés contaminés, crus ou insuffisamment cuits (**Daniels et Shafaie, 2000**).

Les vibrions non cholériques sont des bactéries peu connues du monde médical, leur diagnostic est souvent difficile à établir sur la base de la clinique, du fait de la grande variété des syndromes (**Bertholom, 2019**). La gastroentérite est généralement de gravité modérée, associée à une diarrhée aqueuse moins sévère que celle de *V. cholerae* O1, évoluant spontanément vers la guérison en trois à sept jours. Ces bactéries ont une durée d'incubation très courte, de 12 à 24 heures. Les symptômes peuvent inclure, des crampes abdominales, parfois de la fièvre et des diarrhées sanglantes pour une minorité de patients. Certaines souches peuvent être à l'origine de syndromes de type cholériforme, associées à une diarrhée aqueuse sévère, difficile à distinguer cliniquement du choléra (**Quilici et Pillot, 2011**).

6.2 Virulence

La définition des facteurs de virulence et la compréhension des mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène des souches de *V. cholerae*, sont indispensables à l'évaluation du risque pour la santé publique.

Ainsi, la combinaison des facteurs de virulence impliqués dans le pouvoir pathogène des vibrions, reste encore à déterminer. L'étude des facteurs de pathogénicité de *V. cholerae* a montré que, ces bactéries possèdent de multiples facteurs de virulences, qui ne sont pas similaires pour les souches épidémiques responsables du choléra (séro groupe O1 et O139) et les souches non épidémiques responsables de gastro-entérites (séro groupe non O1 et non O139) (**El Marrakchi, 2012**). Chez les sérogroupes responsables du choléra, on reconnaît plusieurs facteurs de virulence :

- **Toxine cholérique**

V. cholerae colonise l'intestin grêle et secrète une toxine cholérique (CT), qui appartient à la famille de type A-B, cette molécule de 84 kDa est constituée de deux entités

séparément non toxique : l'une d'entre elles (le composant B) est constitué de cinq sous-unités de 11.6 kDa chacune, et porte le site de fixation de la toxine sur son récepteur membranaire. L'autre (le composant A) comporte deux sous-unités de 24 et 5.4 kDa (A1 et A2) reliées par un pont disulfure. Le composant A est responsable de l'activité toxique de la molécule. Ces composants A et B, sont codés par deux gènes CtxA et CtxB localisés sur le même opéron et portés par le bactériophage filamenteux CTX Φ (Daoudi, 2017).

Selon Clemens, la sous-unité B de la toxine cholérique, se lie au récepteurs gangliosides GM1 sur la surface des cellules épithéliales intestinales, et forme un canal par lequel pénètre la sous-unité A qui sera endocytosée à l'intérieure de la cellule, conduisant à l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMPc, ce qui provoque un déséquilibre dans le transport d'électrolyte à travers la membrane cellulaire épithéliale, avec une diminution de l'absorption du sodium et une augmentation des exportations du chlorure (figure 06) (Clemens *et al.*, 2017).

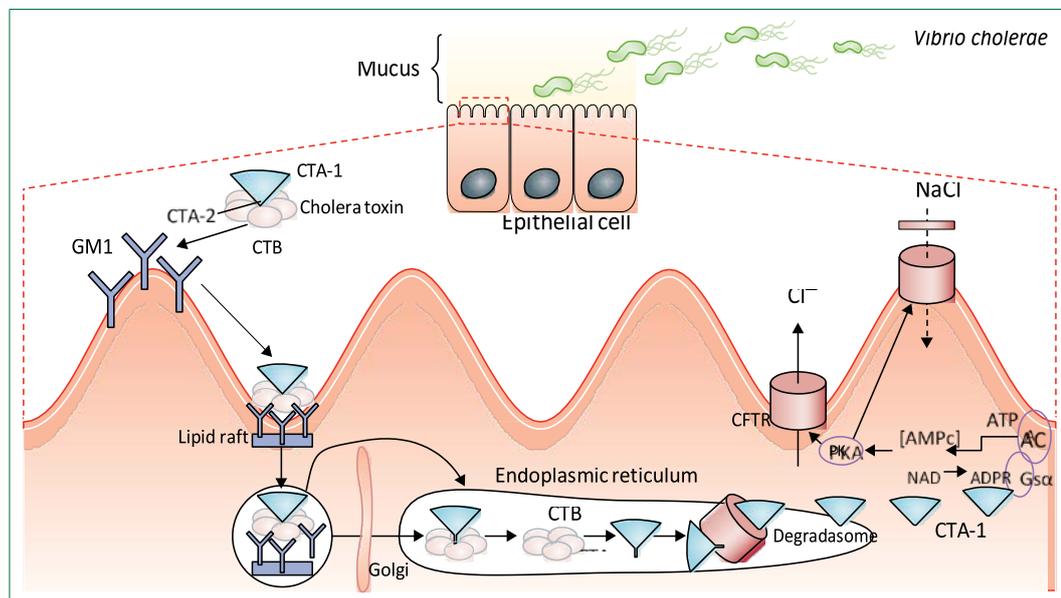


Figure 06 : Pathogénèse du choléra et action des toxines cholériques (Clemens *et al.*, 2017).

- **Toxin coregulated pilus**

La toxin coregulated pilus (TCP), est un pilus de type IV, il contient les gènes responsables de la synthèse des facteurs permettant la colonisation des muqueuses par

V. cholerae. Ces gènes sont regroupés dans l'opéron TCP qui fait partie d'un îlot de pathogénicité VPI, cet îlot est en effet le génome d'un bactériophage VPI Φ , qui se transmet d'un *V. cholerae* à un autre. Ce phage code pour un récepteur permettant au phage CTX Φ de venir incorporer son génome à celui de *V. cholerae* (**Bompangue Nkoko, 2009**).

- **Toxine hémolysine / cytolysine**

C'est une toxine sécrétée dans le milieu extérieur qui agit sur la membrane plasmique, en se liant à des récepteurs cellulaires ou en réalisant des pores dans la membrane. Elle provoque la lyse des érythrocytes. L'hémolysine de *V. cholerae* est une toxine désignée HlyA ou hémolysine El Tor, produite principalement par *V. cholerae* O1 biotype El Tor et des souches non O1, qui joue le rôle d'agent causal de la gastro-entérite (**Labreuche, 2006**). (**Zhang et Austin, 2005**).

Des cytolysines ont été également décrites chez *V. cholerae* O1, biotypes *classique* et *El Tor*. Elles sont sensibles à la chaleur, et participent à la lyse des cellules, à l'accumulation des fluides (électrolytes et eau) et à la destruction des tissus (**Fouche, 1993**).

Pour permettre à ces trois toxines d'agir, l'adhérence de la bactérie aux cellules est nécessaire et constitue une des étapes importantes de la pathogénie. Parmi ces facteurs d'adhérence, le biofilm, les pilis, les flagelles. La chimiotaxie et la mobilité (**Fouche, 1993**).

- **Capsule polysaccharidique**

Pour échapper au système immunitaire de l'hôte et augmenter la survie des vibriens pathogènes dans l'environnement, ces bactéries ont mis en place différentes stratégies. Notamment, la synthèse d'une capsule de nature polysaccharidique par *V. cholerae* O139 et *V. cholerae* non O1. Cette capsule présente plusieurs fonctions: elle intervient dans la prévention de la dessiccation et dans la résistance à la bactéricide et à la phagocytose par les macrophages (**Labreuche, 2006**).

- **Autres facteurs non cholériques**

Les souches de *V. cholerae* non O1 et non O139 possèdent essentiellement trois facteurs de pathogénicité (**Fournier et Quilici, 2002**).

- les entérotoxines thermostables (NAG-ST) : très semblable à celles produites par *Escherichia coli*.

- les hémolysines : identiques à l'hémolysine du biotype El Tor, appelées hémolysine « El Tor like ».
- la capsule polysaccharidique : permet de résister à la phagocytose et provoque des septicémies.

Ces facteurs provoquent généralement des syndromes différents au cholera comme la gastro-entérite, une lésion tissulaires et des septicémies (**Lesne et Fournier, 1998**).

B. Etude épidémiologique

1. Transmission

Le choléra est une maladie très contagieuse, à transmission féco-orale. En 1958, Wager et Lanoix ont identifié les principaux circuits de transmission, et ont développé un schéma, désormais connu sous le nom de « F diagram » ou schéma des voies de transmission féco-orale (figure 07). Cependant, il existe deux voies principales pour la propagation de ce fléau de contamination (**Reed, 2014**).

1.1 Voix hydrique

V. cholerae persiste et voyage dans le milieu marin pendant des mois, voir des années et peut parcourir des milliers de kilomètres. Et c'est lors de la troisième pandémie (1841), que les liens entre le choléra et l'eau ont pu être mis en évidence. Ce fût le médecin londonien John Snow, qui en 1849, publia une théorie faisant de l'eau le vecteur du choléra. Il expliqua que le choléra ne pouvait être transmis par voie aérienne, car la maladie ne touchait pas les poumons (**Pollitzer, 1960**).

Ce mode de contamination se fait soit par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par les selles ou les vomissements, soit par des vecteurs, citons notamment les poissons et les crustacés (**Janny, 2004**).

1.2 Voix interhumaine

La contamination, est à l'origine des mains souillées par les selles, également par les liquides organiques provenant des dépouilles des patients décédés du choléra, via des contacts physiques lors de manipulations de cadavres ou de cérémonies funéraires. Cette transmission est moyennement fréquente par rapport à l'hydrique (**Melin, 2018**).

Les porteurs asymptomatiques ou porteurs sains et les convalescents peuvent également transmettre la maladie (**Dunoyer, 2013**).

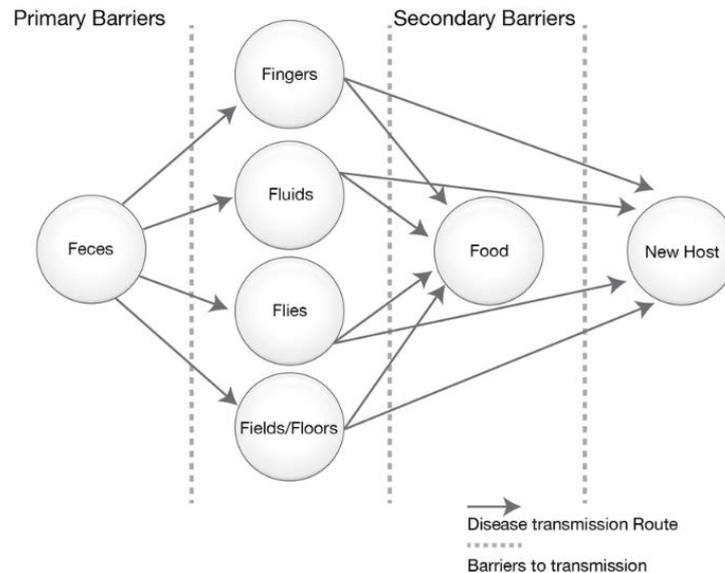


Figure 07 : Le schéma des voies de transmission féco-orale « f diagram »³

2. Epidémiologie

L'évènement épidémiologique du choléra a fait fureur dans tous les pays du monde, dont la propagation n'a pas pu être endiguée. Cette maladie voyage avec l'homme et se diffuse le long de ses itinéraires. Elle a été, l'une des plus grandes épidémies hydriques de l'histoire de l'humanité (figure 08).

2.1 Dans le monde

Au cours de la période 2010-2018, le choléra a continué à se répandre dans le monde, sous sa forme épidémiologique, notamment celles survenues à Haïti et au Yémen.

Chaque année, les cas de choléra varient de 1,3 à 4 millions et les décès varient de 21 000 à 143 000 cas. On estime que cette maladie, peut toucher toutes les tranches d'âge (**Audry et Gaüzère, 2020**).

³ <https://www.researchgate.net>

En 2018, 34 pays ont notifié au total 499 447 cas de choléra à l’OMS, dont 2 990 décès soit, un taux de létalité (TL) de 0,6 %. Le nombre total de cas de choléra signalé à cette date était inférieur à 60 % par rapport à celui de 2017 (**OMS, 2019**).

2.2 En Afrique

L’Afrique a connu, sa plus grande catastrophe aérienne de tous les temps. L’intrusion surprenante du choléra en Afrique, est liée à l’influence accrue des transports aériens. Ce continent a présenté une succession d’épidémies depuis 1970 (**Rémy et Dejours, 1988**).

En 2018, 17 pays Africains ont signalé 120 652 cas de choléra et 2436 de décès, avec une létalité moyenne de 2.0 %. En comparaison avec les statistiques de 2017, on constate une forte régression de la charge du choléra, avec une réduction de 37 % du nombre de cas et de 25 % du nombre de décès (**OMS, 2019**).

La plus récente épidémie d’Afrique a été signalée en 2019, plus précisément au Soudan et au Kenya (**Audry et Gaüzère, 2020**).

2.3 En Algérie

Une petite épidémie a été signalée en Algérie, à Boufarik en août 2018. La dernière remontait à 1996. En effet, le 23/08/2018 le ministère de la santé a déclaré son apparition à Alger. En deux semaines, les autorités sanitaires ont notifié dans les wilayas de Blida, Bouira, Alger et Tipaza, 217 cas suspects du choléra dont 2 décès. Le 15/09/2018 l’institut Pasteur confirme que Oued Ben Azza, situé dans la wilaya de Blida, était le principal foyer du *V. cholerae* et que l’épidémie est à présent maîtrisée (**Beratto, 2018**).

2.4 A Constantine

La ville de Constantine a connu une vague d’épidémie de choléra dans les années 1885. De nombreux décès ont été signalés dans différentes communes citons Hamma, Rouffach, Grarem, Milah, El-Milia, Fedj-M’Zala, Oued Zénati, Ain-Abid etc. Les statistiques officielles ont montré que Fedj M’Zala est la commune qui a enregistré le plus grand nombre de décès, soit un totale de 522 sur une durée de quatre mois. L’origine de la transmission du choléra dans cette commune, est les cours d’eau notamment, oued el Kbir qui déverse dans oued Rhumel provenant de Constantine (**Morsly, 1886**).

L'année 1986, a été caractérisée par un pic de choléra survenu au niveau de la cité Ziadia, faisant 286 cas. Mais depuis, aucun cas n'a été enregistré dans la wilaya (**Direction des ressources en eau**).

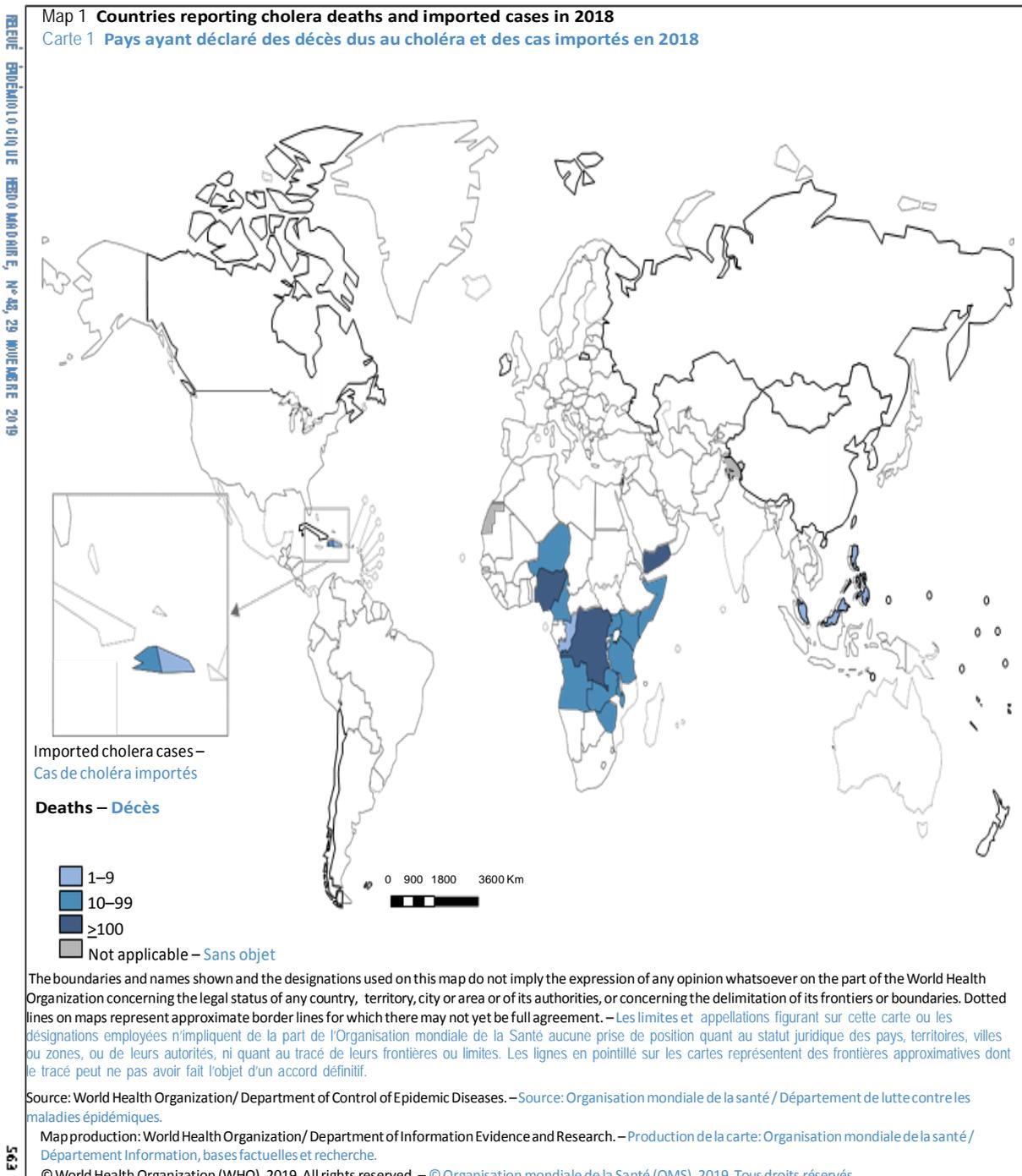


Figure 08 : Répartition géographique du choléra dans le monde selon l'OMS en 2018 (OMS, 2019).

3. Facteurs favorisant l'épidémie du choléra

Les facteurs favorisant la contamination et la transmission du choléra sont à la fois humains, sanitaires et environnementaux :

3.1 Facteurs socio-démographiques

Ils sont favorisés par l'activité et le comportement humains :

- Les grands rassemblements (fêtes, coutumes) : favorisent le manque d'hygiène, un seul cas contaminé engendre la propagation d'une épidémie.
- Les mouvements de populations : des épidémies de choléra ont été favorisées par des déplacements dû à des guerres ou à des catastrophes naturelles.
- L'augmentation de la population : l'appauvrissement ou la paupérisation et l'urbanisation mal contrôlée surtout dans les grandes villes, favorisent les épidémies de choléra. (Janny, 2004).

3.2 Facteurs sanitaires

Ces facteurs sont liés :

- Au manque de ressources sanitaires : insuffisance de structures de santé, de personnel soignant qualifié.
- A la désorganisation des services de santé et d'accès aux soins en cas d'épidémie.
- A l'état de santé précaire de certaines populations (Lavallée, 2001).

3.3 Facteurs environnementaux

Les variations climatiques peuvent aggraver la situation et le nombre de cas de choléra. Généralement *V. cholerae* croit dans les zones humides pendant les saisons de pluie, rarement dans les régions semi-désertiques. Cette bactérie est très fragile à l'air, elle se développe bien dans les eaux saumâtres et survit aussi à la surface des aliments souillés.

Les changements des écosystèmes pourraient aussi favoriser l'émergence de nouvelles souches de *V. cholerae*, comme par exemple : la pollution atmosphérique, le réchauffement de la planète, la déforestation, la sécheresse et les autres catastrophes naturelles (Guevart *et al.*, 2006).

Cependant, il existe d'autres facteurs favorisant l'apparition et la propagation des épidémies de choléra.

C. Etude thérapeutique

1. Traitement curatif

Le choléra est une maladie facile à traiter. Selon l'OMS, le taux de mortalité est inférieur de 1 % des cas atteints de choléra, et ceci grâce à une prise en charge rapide et un traitement adéquat. Le traitement du choléra repose essentiellement à compenser les pertes digestives d'eau et d'électrolytes, la réhydratation est assurée par deux voies selon le degré de déshydratation : soit par voie orale, soit par voie intraveineuse (IV) pour les patients qui sont arrivés en état de choc ou ceux qui ne peuvent pas boire. Ce traitement est basé essentiellement sur des principes de prise en charge des patients (**Piarroux, 2002**).

- Evaluation initiale de l'état d'hydratation, par un examen clinique rapide, qui consiste à rechercher et évaluer le degré de déshydratation (sévère, modérée ou nulle), afin de déterminer le choix du traitement initiale (tableau 05) (**Olson et al., 2018**).

Tableau 05 : Recherche des signes de déshydratation chez le diarrhéique (**OMS, 1992**).

1. OBSERVER: ETAT GENERAL	Normal, éveillé	*Agité, irritable*	*Léthargique ou inconscient; apathique*
YEUX	Normaux	Enfoncés	Très enfoncés et secs
LARMES	Présentes	Absentes	Absentes
BOUCHE ET LANGUE	Humides	Sèches	Très sèches
SOIF	Boit normalement, n'est pas assoiffé	*Assoiffé, boit avec avidité*	*Boit à peine ou est incapable de boire*
2. PALPER: PLI CUTANE	S'efface rapidement	*S'efface lentement*	*S'efface très lentement*
3. CONCLURE:	Le malade n'a PAS DE SIGNES DE DESHYDRATATION	Si le malade a deux ou plusieurs de ces signes, dont au moins un *signe* , en conclure qu'il y a DESHYDRATATION	Si le malade a deux ou plusieurs de ces signes, dont au moins un *signe* , en conclure qu'il y a DESHYDRATATION SEVERE

- Apport liquidien

Des solutés de réhydratation orale (SRO) sont utilisés, dans le cas de déshydratation modéré et sont adapté quantitativement à la morphologie et à l'état du patient. La SRO est constitué de glucose, de sel, de potassium et au choix, du citrate de sodium déshydraté ou du

bicarbonate de sodium (**Boutin et al., 2001**). Dans le cas d'une déshydratation prononcée un volume de Ringer lactate (RL) est administré par voie (IV).

- Maintien de l'hydratation

Lorsque la déshydratation est corrigée, c'est-à-dire le patient ne présente plus de signes de déshydratation, il entre dans une phase d'entretien en compensant les pertes liquidiennes d'eau et d'électrolytes, jusqu'à l'arrêt de la diarrhée et ceci par l'administration d'une solution de (SRO) (**Morillon et Garnotel, 2004**).

- Administration d'une antibiothérapie

L'antibiothérapie est utile, mais pas essentiel pour traiter les patients atteints du choléra. Elle est indiquée dans le cas d'une déshydratation sévère et doit être administrée par voie orale, de préférence dans les premières quatre heures, afin de réduire le volume et la durée de la diarrhée, ainsi que la période d'excrétion du vibrion dans les selles (**Olson et al., 2018**).

L'indication de l'antibiothérapie suscite quelques discussions et le choix de l'antibiotique dépend de l'antibiogramme réalisé au début d'épidémie, en raison du développement de multirésistance de la part de *V. cholerae*. Selon les recommandations de l'OMS, dans les cas graves de déshydratation, l'administration par voie orale est nécessaire des antibiotiques suivants : Doxycycline, Tétracycline et Erythromycine (tableau 06).

Tableau 06 : Le traitement de choléra déclaré par l'OMS (OMS, 2004).

Choléra			
Doxycycline monodose	300 mg		
ou tétracycline	12,5 mg/kg	4 fois/jour	pendant 3 jours
Jeune enfant : érythromycine en solution	12,5 mg/kg	4 fois/jour	pendant 3 jours
Note : il y a une résistance croissante à la doxycycline, à la tétracycline et au TMP-SMX.			
© Organisation mondiale de la Santé 2004		OMS • GROUPE SPÉCIAL MONDIAL DE LUTTE CONTRE LE CHOLÉRA	

- Alimentation

La reprise d'une alimentation normale est nécessaire, dès que les vomissements cessent. Cependant, deux complications peuvent survenir au cours du traitement, selon que ce dernier est insuffisant ou excessif : l'insuffisance rénale ou l'œdème pulmonaire (**Olson et al., 2018**).

- Prise en charge de populations spécifiques

Chez les femmes enceintes, les jeunes enfants, les enfants souffrant de malnutrition sévère, définie par des critères cliniques ou d'anémie aigue, les principes de réhydratation restent les mêmes sauf que, l'examen initial et les traitements doivent être adaptés à cette catégorie de personnes (**Olson et al., 2018**).

2. Traitement préventif

2.1 Vaccination

Toute vaccination doit être basée sur l'utilisation de vaccins efficaces et inoffensifs qui permet une protection contre la maladie, c'est-à-dire sans provoquer des dangers pour la santé publique. A ce jour, il existe trois types de vaccins anticholériques (**Lesne et Fournier, 1998**).

- Un vaccin sous cutané classique, constitué par une suspension de germes tués par le Phénol. Ce vaccin donne une protection de 50 % pour une durée de 6 mois, cette immunité est insuffisante et fait déconseiller son usage (**Traore, 2008**).

- Les deux autres vaccins anticholériques oraux sont préqualifiés par l'OMS : un vaccin monovalent (O1), avec sous-unité recombinante B de la toxine du choléra, et un bivalent (O1 et O139), sans la sous-unité B (**OMS, 2018**). Ils consistent à administrer une petite dose de la bactérie responsable du choléra par voie orale. Cette dose de bactérie a été tuée ou modifiée de manière à ne pas provoquer de diarrhée, tout en immunisant le récepteur contre le choléra naturel (tableau 07) (**Sinclair et al., 2011**).

Tableau 07 : Les différents vaccins oraux de choléra (Daoudi, 2017).

Les vaccins	Types de vaccination	Administration	La durée de vie	Conservation	Intervalle entre deux doses	Efficacité
Dukoral	Monovalent inactivé	Voie orale	3 ans	2-8°C	7 jours	>50%
Shanchol et mORCVAX	Bivalents	Voie orale	2 ans	2-8°C	14 jours, au bout de 2ans	>50%

Enfin, les campagnes de vaccination absorbent des ressources financières et humaines déjà limitées qui pourraient aller à des mesures plus efficaces de lutte (Mitze *et al.*, 1994). C'est pour cela qu'à l'heure actuelle l'OMS ne recommande aucun vaccin, surtout en période d'épidémie, en tant que mesure de santé publique, même si leur efficacité et leur intérêt potentiel ne fait pas de doute.

2.2 Prophylaxie

La maîtrise des épidémies ou des pandémies du choléra causées par *V. cholerae*, consiste à l'application des mesures de prophylaxie (d'hygiène) et l'utilisation de la vaccination comme moyen complémentaire de ces mesures. Les mesures d'hygiène comprennent:

- La mise en place d'un approvisionnement qualitatif de l'eau, en créant des équipements d'hygiène publiques, permettant notamment de protéger les ressources en eau de consommation et de distribuer l'eau traitée et désinfectée.
- L'éducation sanitaire de la population.
- La protection de la contamination des milieux aquatiques récepteurs, par un traitement épurateur des eaux usées.
- Améliorer la sécurité et l'hygiène alimentaire ainsi que, les pratiques de lavage des Mains.
- La promotion d'un système d'eau potable et de services d'assainissement.

Selon Fournier et Quilici, ce sont ces mesures qui ont permis l'éradication du choléra dans les pays développés tandis que dans les pays en développement, l'élévation des niveaux d'hygiène, est loin d'être réalisée pour des raisons économiques et socio-culturelles (Fournier et Quilici, 2007).

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Constantine, durant une période allant du 15/02/2020 au 19/03/2020, sur des prélèvements d'échantillons d'eaux usées. Ces derniers, ont été réceptionnés au niveau du service bactériologie des eaux et des aliments, dans le but de la recherche des vibrions cholériques.

1. Prélèvement

L'échantillon destiné pour la recherche des vibrions cholériques est, l'eau usée. Nous avons prélevé au total cinq échantillons d'eau, répartis dans trois zones différentes Oued Boumerzoug, Oued Rhumel et la STEP d'Ibn Ziad (figure 09). Cette diversification des sites a pour objectif, d'augmenter nos chances de trouver des vibrions cholériques.

Ces prélèvements ont été effectués, à l'aide d'une bouteille propre et vide, accrochée par une corde, puis plongée directement dans la source. Ensuite, à l'aide d'un entonnoir stérile, on remplit les flacons d'eau péptonée alcaline 10 fois concentrée (milieux de transport). Cependant, cette étape n'a pas été facile, en raison du danger de l'oued, son accès difficile, les berges qui le bordent, la pente accentuée et le terrain accidenté et glissant, sans oublier les risques de contamination.



Figure 09 : Lieu des prélèvements des eaux usées de Oued Boumerzoug (A) et (C), Oued Rhumel (B) et (D) et la STEP d'Ibn Ziad (E).

1.1 Présentation de la zone d'étude

▪ Localisation de la station d'épuration d'IBN ZIAD

La station d'épuration des eaux usées, d'Ibn Ziad, est située à 12 km de la ville de Constantine, dans la daïra de Hamma Bouziane, sur la route de Mila (figure 10). Elle s'étend sur une superficie de 12 Hectares. Elle se localise entre 6° 30 et 6° 45 Nord et entre 36° 15 et 36° 30 Est. Elle se trouve au Nord de la Mechtat Ouldjet el Cadi, en bas de la route nationale N° 2 (A.N.P.E, 1996).

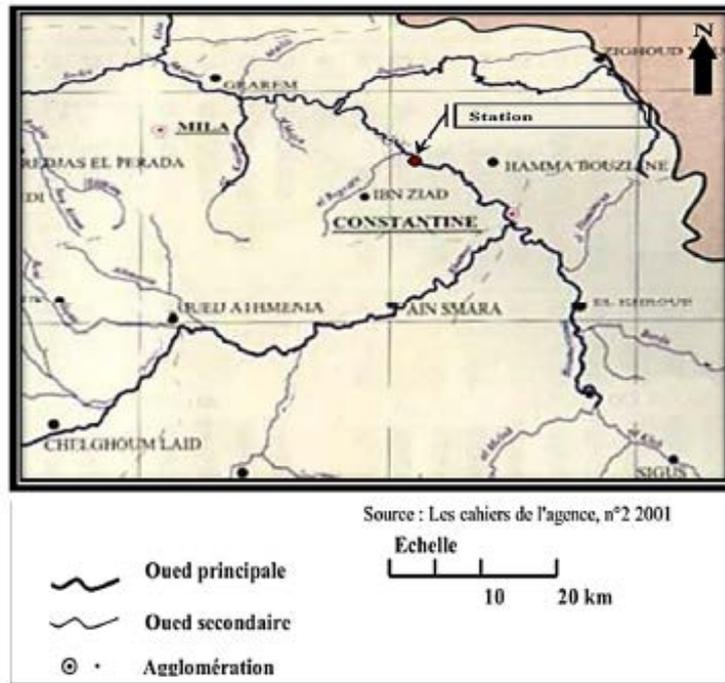


Figure 10 : Carte géographique de la localisation de la STEP d'Ibn Ziad (A.N.P.E, 1996).

▪ Localisation de Oued Boumerzoug et Oued Rhumel

Le bassin du Rhumel couvre une superficie de 5300 km². Son relief est caractérisé par une altitude moyenne de 800 m. L'Oued Rhumel est long de 125 km et son principal affluent, l'Oued Boumerzoug est long d'environ 32 km (figure 11). La principale ville qui longe les deux oueds est Constantine qui représente 43 % de la population du bassin (Afri-Mehennaoui et Mehennaoui, 2004).

Tableau 08 : Fiche de suivi des prélèvements par échantillon.

		Oued Boumerzoug	Oued Rhumel
1 ^{er} prélèvement 15/02/2020	Lieu	Rejet d'El Djoudour	Rejet de Bidi Louiza
	Code	A	B
	Temps	Sec 19°C	
	Heure	9h 28	9h 50
2 ^{ème} prélèvement 22/02/2020	Lieu	Avant SNTV	Après SNTV
	code	C	D
	Temps	Sec : 16°C	
	Heure	9 h	10 h
		STEP D'Ibn Ziad	
3 ^{ème} prélèvement 03/03/2020	Lieu	L'entrée de la STEP	
	code	E	
	Temps	Pluvieux : 11°C	
	Heure	13 h	

1.3 Transport des échantillons

Le prélèvement a été effectué dans un flacon de 500 ml, contenant 50 ml d'eau peptonée alcaline 10 fois concentrée (EPA 10×c) (Annexe 01), qui est un milieu de transport pour assurer la viabilité des vibrions et de 450 ml d'eau à échantillonner (figure 12).

Les échantillons doivent être transportés dans une glacière fermée contenant des accumulateurs de glace, afin de maintenir une température inférieure à 10°C. La glacière doit être lavée et désinfectée après chaque utilisation (**Sudre et Goff, 2011**).



Figure 12 : Flacon de 500 ml contenant l'eau usée et le milieu de transport (EPA 10×c).

2. Enrichissement

Les échantillons d'eaux usées, prélevés sur EPA 10×c, sont acheminés directement au laboratoire, ils sont mis en incubation à 37°C pendant 6 à 18 heures. Puis, ils subissent une succession de cultures en EPA simple (20 ml), en inoculant une öse avec une anse de platine stérile, du voile qui apparaît à la surface du flacon, dans un autre tube et qui sera par la suite incubé à 37°C pendant 6 à 18 heures. Cependant, il ne faut surtout pas agiter les flacons ou les tubes, car les vibrions ont tendance à se développer à la surface de ces derniers (Cheryl *et al.*, 2002).

L'intérêt principal de la méthode d'enrichissement, en EPA 10×c et en EPA simple, pour le diagnostic bactériologique du choléra, est de sélectionner les vibrions en général et en particulier les vibrions cholériques vue, leur aptitude à se multiplier en milieu alcalin et salé, plus rapidement que les autres germes, de permettre leur développement et leur croissance. Ainsi, il peut faciliter l'isolement de *V. cholerae* lorsque peu de micro-organismes sont présents (Quilici, 2011).

3. Isolement

L'isolement des vibrions cholériques, est réalisé à partir des milieux d'enrichissement sur une gélose nutritive alcaline biliée (GNAB) (Annexe 01), par un ensemencement d'une öse en stries selon la méthode des cadrans, puis incubé à 37°C pendant 24 heures. Notant que, cet isolement est répété trois fois de suite (1 isolement par jours) dans le but d'inhiber les autres bactéries. La sélectivité de ce milieu est basée sur un pH élevé et la présence de bile de bœuf qui est un inhibiteur de la plupart des bactéries à Gram (+) (Delarras, 2014).

D'autre part, il est nécessaire de faire plusieurs ré-isolement pour arriver au vibron recherché. Cette étape nous a pris beaucoup de temps et ceci s'explique par la présence d'une panoplie de microorganismes dans l'eau, qui est considérée comme un siège de vie microbienne.

4. Identification morphologique

4.1 Examen macroscopique

C'est l'étude de l'aspect des colonies qui nécessite l'observation à l'œil nu, en lumière naturelle, par éclairage directe et par transparence des colonies. L'étude macroscopique est basé sur la caractérisation de la taille, la forme, la couleur, la consistance de chaque espèce.

4.2 Examen microscopique

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne.

- **Examen direct à l'état frais**

C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, en milieu liquide (Annexe 03). Il permet d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie.

Pour mettre en évidence la mobilité des vibrons, nous avons effectué la technique de lutage à la paraffine (figure 13), qui consiste à luter la lamelle, en bordant ses extrémités avec une matière contenant la cire, telle qu'une bougie. Cette technique a pour but d'immobiliser le flux et d'éviter la diffusion du liquide.



Figure 13 : Photographie représentant la technique de lutage de la lamelle.

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram (Annexe 03), est un examen très important, qui utilise les propriétés de la paroi bactérienne et donne une information rapide sur la forme et le type des bactéries présentes dans l'échantillon ainsi que leur mode de regroupement.

5. Identification biochimique

5.1 Etude du type respiratoire

5.1.1 Recherche de l'oxydase

Principe : La recherche de l'oxydase (Annexe 02) est un des critères discriminatifs le plus employé pour mettre en évidence la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet « l'indophénol » (**Hayette et al., 2010**).

Technique : Ce test est réalisé à l'aide d'un disque prêt à l'emploi, imprégné du réactif N-diméthyle paraphénylène diamine et déposé sur une lame, puis imprégné d'une goutte de l'eau distillée stérile et à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous avons prélevé une colonie pure à partir d'une culture jeune du milieu GNAB et on l'a déposée sur le disque. Le résultat sera lu immédiatement au bout de 30 secondes.

5.1.2 Recherche de la catalase

Principe : La catalase (Annexe 02) est une enzyme, ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 avec dégagement d'oxygène (**Hayette et al., 2010**).

Technique : Nous avons prélevé à l'aide d'une anse de platine stérile, une colonie à partir de la boîte de pétri du milieu GNAB et nous l'avons déposée dans un tube à hémolyse contenant de l'eau oxygénée H_2O_2 . La lecture se fait immédiatement.

5.2 Etude du métabolisme glucidique

▪ Préparation de l'inoculum

Nous avons préparé une suspension bactérienne dans un tube à essai stérile contenant 3 ml d'eau physiologique stérile, et à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on a inoculé une colonie bien isolée d'une culture jeune 15 à 24 heures. Cette suspension est par la suite homogénéisée et utilisée dans plusieurs tests biochimiques, métaboliques et autres tests.

5.2.1 Fermentation des sucres

Principe : Le milieu TSI (Annexe 01) est un milieu d'indentification rapide des vibrions, il permet de mettre en évidence la fermentation du glucose, du lactose, et du saccharose ainsi que la production du gaz et d' H_2S (Delarras, 2007).

Technique : La pente du milieu TSI estensemencée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile qui contient la suspension bactérienne, l'ensemencement se fait par des stries et le culot par piqure centrale, puis incubation à 37°C pendant 24 heures.

5.2.2 Mannitol-Mobilité

Principe : Le milieu mannitol-mobilité (Annexe 01) est utilisé pour la différenciation rapide du vibron, il permet de déceler la dégradation du mannitol et la mobilité de la bactérie (Chouini et Tabouche, 2013).

Technique : Nous avons prélevé quelques gouttes de notre suspension bactérienne déjà préparé en utilisant une pipette Pasteur stérile. L'ensemencement se fait par une simple piqure centrale jusqu'au fond du tube, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

5.2.3 Utilisation du Citrate

Principe : Le milieu citrate de sodium (Simmons) (Annexe 01), est utilisé pour l'identification des bacilles à Gram négatifs. Ce milieu contient le bleu de Bromothymol comme indicateur de pH, il permet de rechercher l'utilisation de citrate de Simmons comme seul source de carbone (Delarras, 2007).

Technique : Nous avons réalisé un ensemencement sur le milieu Citrate de Simmons, en utilisant une pipette pasteur stérile contenant la suspension bactérienne avec des stries longitudinales sur la pente du milieu. La lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

5.2.4 Recherche de la β -galactosidase

Principe : Le test ONPG (Ortho-Nitro- Phényl-Galactopyranoside) ou le test de l'ONPG - hydrolase (Annexe 02) est complémentaire, voire indispensable à l'étude de la dégradation du lactose chez les vibrions, pour qu'ils dégradent le lactose, il faut qu'ils possèdent deux enzymes :

- La lactose perméase qui permet au lactose de pénétrer dans la bactérie.
- La β -galactosidase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

Le test ONPG consiste, à rechercher la présence de β -galactosidase, on utilise un substrat synthétique l'ortho-nitro-phényl-galactosidase qui possède une structure analogue au lactose et capable de pénétrer dans la bactérie, sans perméase et qui va être hydrolysé en orthonitrophénol : ONP qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu (**Euzebey, 2007**).

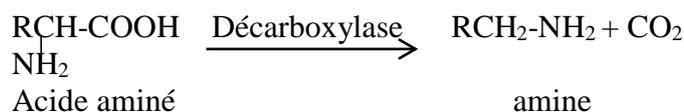
Technique : A partir de la même suspension bactérienne des vibrions nous avons versé une petite quantité dans un tube à essai stérile, puis à l'aide d'une pince stérile, on a déposé un disque d'ONPG, cette préparation a été incubée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

5.3 Etude du métabolisme protéique

5.3.1 Recherche des enzymes de décarboxylase

Principe : Le milieu de culture Moeller utilisé pour la différenciation des vibrions est basé sur la détection de la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH). (Annexe 01).

Les décarboxylases scindent les acides aminés en condition d'anaérobiose et de pH acide (pH = 3.5-5.5). Elles entraînent la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO₂ (**Denis et al., 2012**).



Technique : Le test est réalisé avec milieu Moeller réparti dans quatre tubes à hémolyse différents : Le premier tube est le témoin : il contient du glucose en petite quantité et du Pourpre de Bromocrésol comme indicateur du pH. Les trois autres tubes contiennent un des trois acides aminés suivant : Arginine, Lysine ou Ornithine en plus du milieu témoin.

L'ensemencement se fait par l'ajout de deux à trois gouttes de la suspension bactérienne déjà préparée dans les quatre tubes, puis rajoute 1ml de vaseline stérile dans chaque tubes, pour crée un environnement d'anaérobiose et le tout sera incubé pendant 24 heures à 37°C.

5.3.2 Milieu Urée-indole

Principe : Le milieu Urée-Indole (Annexe 01), est un milieu de culture synthétique qui permet la mise en évidence chez les vibrions, la présence d'une uréase et la production d'indole. Il permet ainsi la différenciation présomptive des bactéries possédant ces caractères (Euzeby, 2007).

Technique : Nous avons distribué stérilement une petite quantité du milieu Urée-Indole dans un tube à essai. L'ensemencement se fait en ajoutant avec une pipette pasteur stérile la suspension bactérienne des vibrions. Après un temps d'incubation de 24 heures à 37°C on a versé 4 à 5 gouttes de réactifs Kovacs (Annexe 02) dans le tube du milieu Urée-Indole ensemencé et la lecture se fait immédiatement.

6. Teste d'agglutination

Des tests d'agglutination viennent compléter l'identification bactérienne, dans le but de déterminer s'il s'agit de *V. cholerae* O1 et O139 ou des vibrions non cholériques non O1 et non O139. Par défaut des sérums d'agglutinations anti-Vibrion cholérique, polyvalent Ogawa - Inaba (périmés), le test d'agglutination n'a pas été réalisé.

7. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de Kirby-Bauer (recommandée par l'OMS) qui est basée sur la diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton (MH) (Chouini et Tabouche, 2013). A partir de l'inoculum préalablement préparé d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, nous avons prélevé quelques gouttes à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et nous les avons inoculés dans un bouillon de cœur cervelle (Annexe 01). Après une incubation de 24 heures à 37°C, il devient trouble, on inocule alors quelques gouttes de ce bouillon dans un tube contenant 2.5 ml d'eau physiologique stérile. L'ensemencement se fait par inondation de ce dernier sur la surface du milieu Muller-Hinton suivi de la déposition à l'aide d'une pince stérile des disques d'antibiotiques. L'antibiotique testé est la Colistine, nous l'avons mis au milieu de la boîte et nous l'avons incubé à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures en position renversée. La (figure 14), présente le schéma de la Procédure que nous avons réalisé au niveau du laboratoire pour l'identification de *V. cholerae* dans les échantillons d'eaux usées.

Résultats et discussion

Dans le but de la recherche des vibrions cholériques, nous avons réalisé un stage pratique au niveau du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Constantine. Pour notre étude, nous avons prélevé cinq échantillons d'eau usée. Les résultats obtenus sont regroupés dans le (tableau 09) ci-dessous.

Tableau 09 : Résultats de la recherche des *V. cholerae* dans l'eau usée de Oued Boumerzoug, Oued Rhumel et la STEP d'Iben Ziad.

Lieu	Date	Prélèvement	Résultats
Oued Bouerzoug	15/02/2020	A	Absence
	22/02/2020	C	Présence
Oued Rhumel	15/02/2020	B	Présence
	22/02/2020	D	Absence
STEP d'Ibn Ziad	03/03/2020	E	Présence

1. Enrichissement

La culture en eau peptonée alcaline donne après une incubation à 37°C pendant 6 à 18 h, un trouble net et uniforme avec formation d'un voile à la surface du tube (figure 15). Selon Quilici (2011), le voile commence à apparaître après quelques heures de culture chez *V. cholerae*.



Figure 15 : Résultats de l'enrichissement dans l'EPA.

2. Identification morphologique

2.1 Identification macroscopique

Nous avons réalisé plusieurs isollements sur milieu GNAB, près de quinze souches suspectes de vibrion cholérique ont été isolées. Mais, seulement trois d'entre elles ont été les plus caractéristiques. Macroscopiquement, ces souches apparaissent sous un aspect de colonies nommées smooth. Ces colonies, sont de taille moyenne environ 2 mm de diamètre, bien rondes à bord réguliers, lisses, faiblement convexes, bleutées et translucides (comme du verre) (figure 16). Cette description correspond à la description des *V. cholerae* qui a été réalisé par Daoudi (2017).

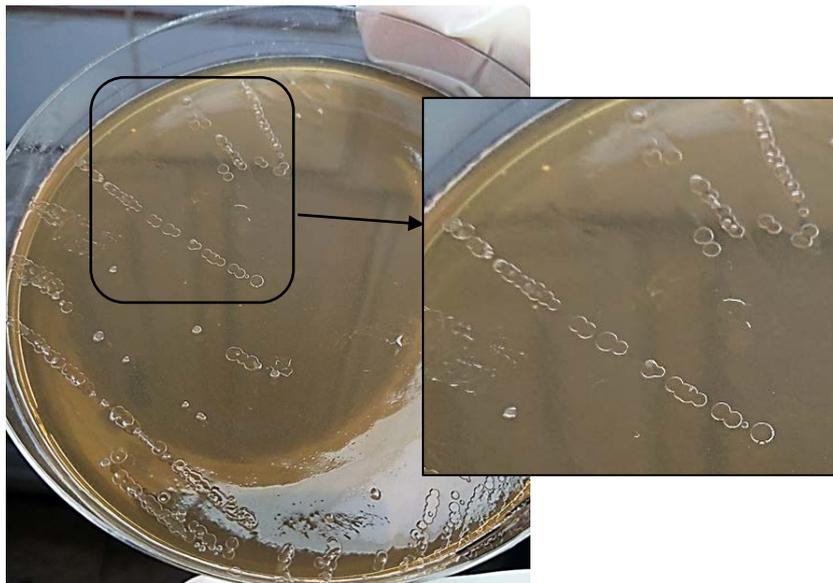


Figure 16 : Photographie représentant l'aspect macroscopique des colonies suspectes sur milieu GNAB.

2.2 Identification microscopique

- **Coloration de Gram :** nous avons fait une observation de plusieurs isolats suspects et seulement les trois souches isolées ont révélé d'après cette coloration, une flore monomorphe, faite de petits bacilles fins, incurvés, isolés, colorés en rose « Gram négatifs » (figure 17). Ce résultat est approuvé par Fournier et Quilici (2007), qui souligne que *V. cholerae* est une bactérie à Gram négatifs.
- **Etat frais :** nous avons observé les trois souches entre lame et lamelle ; elles ont révélé de petits bacilles en très grande abondance, qui ont une mobilité de type

polaire (figure 18). la plupart des *Vibrio* sont mobile grâce à un flagelle, ceci a été montré dans l'étude de Bonhomme (2003).

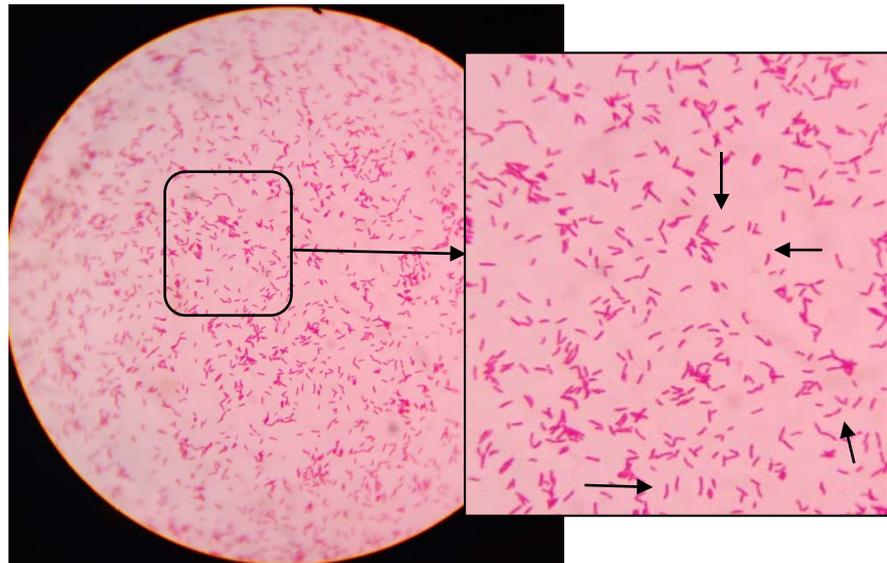


Figure 17 : Photographie d'une observation microscopique d'un isolat suspect après une coloration de Gram (objectif x 100).

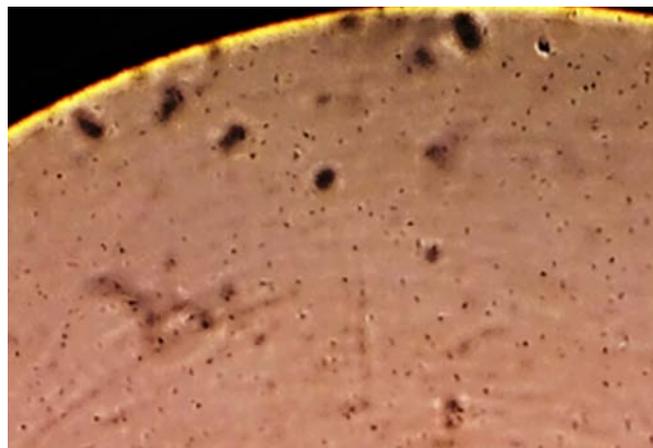


Figure 18 : Photographie d'une observation microscopique d'un état frais (objectif x 40).

3. Identification biochimique

L'identification biochimique est un examen qui permet, d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ses caractères biochimiques. Nous avons effectué une galerie d'identification classique des trois souches suspectes (figure 19 et 20 et 21), dont les résultats sont représentés dans le (tableau 10). Ainsi que des tests tels que l'oxydase et la catalase ont été réalisés.



Figure 19 : Photographie du résultat de la galerie biochimique classique de la souche 1.



Figure 20 : Photographie du résultat de la galerie biochimique classique de la souche 2.



Figure 21 : Photographie du résultat de la galerie biochimique classique de la souche 3.

Tableau 10 : Résultats des galeries biochimiques d'identification des 3 souches suspectes.

Tests		Résultats		
		Souche 1	Souche 2	Souche 3
ONPG		+	+	+
TSI	Glucose	+	+	+
	Lactose	+	+	+
	Saccharose	+	+	+
	Gaz	-	-	+
	H ₂ S	-	-	-
Mannitol-Mobilité	Mannitol	+	+	+
	Mobilité	+	+	+
Urée-Indole	Urée	-	-	-
	Indole	+	+	+
Enzymes décarboxylases	ADH	-	-	+
	LDC	+	+	+
	ODC	+	+	-
	Témoin	Jaune	Jaune	Jaune
Citrate		-	-	-

3.1 Test de l'oxydase

Les trois souches retenues ont révélé un résultat positif, dû à l'apparition immédiate d'une coloration violette (figure 22). Ce résultat est en cohérence avec le travail de El Marrakchi (2012), qui révèle que les *Vibrio* sont des oxydases positif.



Figure 22 : Résultats du test d'oxydase.

3.2 Test de la catalase

Les trois souches possèdent la catalase, elles sont dites catalase positive. Cette réaction se manifeste par la production de bulles d'oxygène (figure 23), selon la réaction suivante :



L'étude de Bonhomme (2003), a révélé également que les membres du genre *Vibrio* sont catalase positif.



Figure 23 : Résultat du test de la catalase.

3.3 Milieux TSI

Ce milieu nous a permis d'identifier cinq caractères :

- Glucose + : La fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot.
- Lactose + / Saccharose + : La fermentation du lactose et du saccharose se traduit par le virage au jaune de la pente.
- Gaz - : Absence de production de gaz et absence de décollement de la gélose.
- H₂S - : Absence de production d'H₂S et absence du noircissement du milieu.

Le résultat de ce test, est en concordance avec les caractères biochimiques de *V. cholerae* dans l'étude de Daoudi (2017).

3.4 Test du mannitol-mobilité

Les souches de vibrion ont fermenté le mannitol, dont la fermentation de ce dernier a été matérialisée par un virage de l'indicateur coloré, le rouge de phénol au jaune. En ce qui concerne la mobilité, elle se traduit par la diffusion de la bactérie à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble homogène.

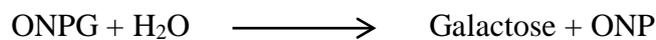
Fouche (1993), a rapporté que *V. cholerae* est une bactérie qui fermente le mannitol.

3.5 Utilisation du Citrate

Les souches étudiées, n'ont pas utilisé le citrate et sont alors des citrates négatifs. Selon Daoudi (2017), les vibriens possèdent une citrate perméase. L'utilisation du citrate par ces bactéries, se traduit par une alcalinisation du milieu, provoquant un virage de l'indicateur coloré le bleu de Bromothymol, du vert au bleu, ce qui signifie une libération d'ammoniaque.

3.6 Recherche de la β -galactosidase

Apparition d'une coloration jaune, ce qui indique que les souches de vibron sont pourvues de la β -galactosidase. Cette couleur est due à la libération de l'orthonitrophénol par l'hydrolyse de l'ONPG, selon la réaction suivante :



La capacité de *V. cholerae* à produire la β -galactosidase a été rapportée par Fouche (1993).

3.7 Recherche des décarboxylases

Pour les souches 1 et 2, les milieux LDC et ODC n'ont pas changé de couleur, ils sont restés violet, ce qui signifie que la bactérie fermente le glucose et entraîne une acidification du milieu, puis une réalcalinisation par la dégradation du substrat (Lysine et Ornithine). Par contre, le milieu ADH a changé de couleurs et il est devenu jaune, ce qui signifie que la bactérie a fermenté le glucose et entraîne une acidification, mais pas de réalcalinisation du milieu, car elles ne possèdent pas une enzyme qui dégrade et décarboxyle le substrat (Arginine). Les décarboxylases sont :

- La lysine décarboxylase (LDC) : Lysine \longrightarrow Cadavérine + CO₂
- Ornithine decarboxylase (ODC): Ornithine \longrightarrow Putricine + CO₂
- L'arginine dihydrolase (ADH): Arginine \longrightarrow Agmatine+ CO₂

V. cholerae sont LDC (+), ODC (+) et ADH (-), ce résultat a été rapporté également par Quilici (2011).

Par contre, la souche 3 a révélé un résultat positif pour LDC et ADH et négatif pour l'ODC.

3.8 Milieu Urée-Indole

Les souches n'ont pas production l'uréase, le milieu reste jaune donc on constate, une absence d'hydrolyse de l'urée.

La production d'indole, se caractérise après l'addition de quatre à cinq gouttes de réactifs de Kovacs, par l'apparition immédiate d'un anneau rouge en surface du milieu, qui est due à la dégradation de tryptophane en indole, selon la réaction suivante :



Quillici (2011), montre que *V. cholerae* ne produit pas d'uréase mais, elle est indole positif.

4. Antibiogramme

L'étude du profil de la résistance et de la sensibilité des vibrions, a été réalisée sur deux souches, sur la gélose (MH). Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions obtenues vis-à-vis de l'antibiotique testé « la Colistine », sont représentés dans la (figure 24) (tableau 11).

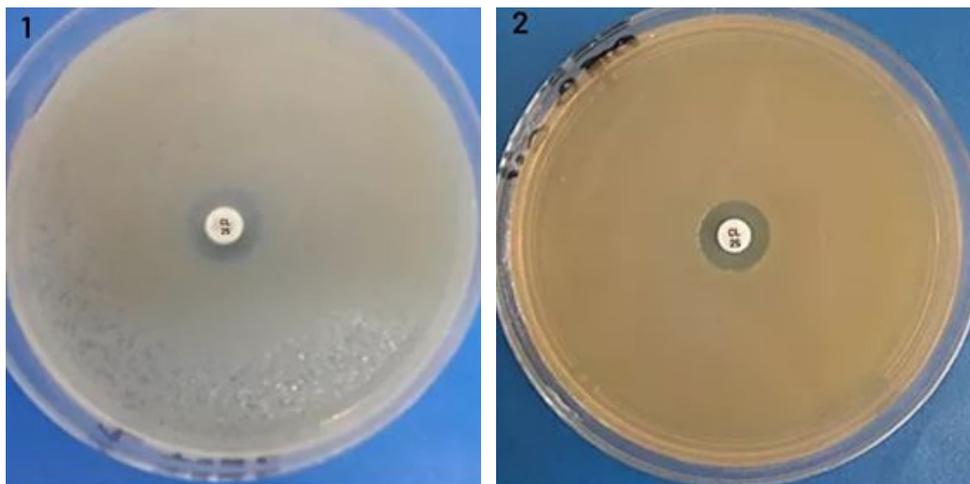


Figure 24 : Résultat de l'antibiogramme des souches 1 et 2.

Tableau 11 : Profil de sensibilité des souches 1 et 2 vis-à-vis des antibiotiques testées.

Antibiotique	Abréviation	Charge du disque (µg)	Diamètres critique (mm)		Diamètres lus (mm)		Résultat
			S	R	Souche 1	Souche 2	
Colistine	CL	25	15≤	15>	15	15	S

S : souche sensible vis-à-vis l’antibiotique testé.

R : souche résistante vis-à-vis l’antibiotique testé.

Discussion générale

Sur un total de cinq prélèvements d’eaux usées, seulement trois prélèvements (B), (C) et (E) ont montré des souches suspectes désignées respectivement 1, 2 et 3.

A partir des résultats d’enrichissements, on a constaté qu’il existe la formation d’une voile à la surface du milieu EPA uniquement dans les trois échantillons qui sont : (B) prélevé d’Oued Rhumel, (C) prélevé d’Oued Boumerzoug et (E) de la STEP d’Ibn Ziad. Cela ouvre l’hypothèse d’existence des vibrions dans ces trois zones. L’apparition du voile s’explique par le fait que toutes les espèces de vibrions poussent plus ou moins à sa surface, en raison de leurs besoins en oxygène et de leur mobilité. De cela, un isolement a été réalisé sur le milieu GNAB sur lequel nous avons repéré des colonies suspectes pour ces trois prélèvements (B, C et E).

L’observation microscopique de la coloration de Gram et l’examen à l’état frais, ainsi que les tests d’oxydase et de catalase, ont révélé que les trois souches isolées ont les mêmes caractères : très mobiles, Gram négatif, catalase positive et oxydase positive, de ce fait ils appartiennent à la famille des *Vibrionaceae*.

D’après les résultats des galeries biochimiques des trois souches, nous avons constaté deux galeries identiques de la souche 1 et 2 et une troisième différente qui est la souche 3. D’après les résultats de l’étude des acides aminés de la souche 1 et 2 ADH (-), LDC (+) et ODC (+), nous avons confirmé qu’elles appartiennent au genre *Vibrio*, contrairement à la troisième souche qui est différente au niveau de ces tests et dont le résultat obtenu est ADH (+), LDC(+) et ODC (-), ainsi qu’une légère production de gaz. Ceci nous a mené à rapprocher cette souche à l’espèce *Aeromonas hydrophila*, qui appartient au genre *Aeromonas*. Les caractères biochimiques de cette bactérie sont montrés par Clave (2010).

Cette espèce présente les mêmes caractères biochimiques obtenus, mais ceci reste à confirmer par d'autres tests. Selon les caractères biochimiques de la souche 1 et 2, on constate qu'elles présentent une grande similarité, ce qui permet de les rapprocher à l'espèce *V. cholerae*.

L'étude du profil de sensibilité des vibrions, nous a montré que les deux souches 1 et 2 du prélèvement (B) et (C) présentent un taux de sensibilité dans des limites supérieures avec l'antibiotique testé : Colistine 25 µg.

Face à la crise sanitaire que nous traversons, suite à la pandémie du COVID19, nous n'avons pas eu la possibilité de terminer notre stage dans le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Constantine. Il nous a été impossible de nous déplacer vers l'université pour ramener des galeries API 20NE, après avoir confirmé leurs disponibilités, en raison de l'ordre de fermeture des universités. Nous avions aussi prévu un passage au CHU de Constantine pour effectuer les tests d'agglutination. L'annonce des nouvelles décisions du confinement sur tout le territoire algérien a entravé la continuation de notre étude.

On déduit que si le test donne une agglutination avec les sérums anticholérique, cela signifiera la présence du *V. cholerae* O1 ou O139 et si le test ne donne pas d'agglutination, donc il s'agirait des vibrions non agglutinant (NAG) *V. cholerae* non O1 ou non O139.

D'après les résultats de notre recherche, on déduit la présence de souches de *Vibrio* qui sont probablement les (NAG) *V. cholerae* non O1 et non O139 dans l'eau usée, provenant de Oued Boumerzoug et de Oued Rhumel. Ceci s'explique par le pH et la salinité de ces milieux qui ont permis le développement des vibrions. La température est également le facteur majeur qui conditionne le comportement des vibrions dans leur milieu. Il est en effet plus fréquent d'isoler, la bactérie pendant la saison chaude, que pendant l'hiver. Mais aussi, dans les périodes de précipitations, les fortes pluies et les ruissellements, qui facilitent la circulation du vibron dans son milieu. Ce dernier est souvent entouré de bidonvilles et d'industries, en effet leurs déchets ménagers et égouts sont acheminés vers Oued Rhumel, ce qui favorise la propagation de la maladie.

En plus des facteurs environnementaux et climatiques, les résultats de notre étude, s'expliquent également par le fait, que le choléra a évolué vers un modèle complexe de maladies infectieuses écologiques, qui résulte en effet de la variabilité des réservoirs aquatiques (zooplanctons et phytoplanctons), des bactériophages dans l'environnement aquatique et de la flexibilité de son génome. Il suffit qu'une souche de vibron pathogène,

soit introduite en été ou en automne, par les aliments ou par un arrivage des étrangers. Le vibron se prolifère alors dans les eaux.

D'autres études de Diakite et Mounkoro (2015), sont incompatibles avec nos résultats, vu qu'ils ont prouvé l'absence du *V. cholerae* dans les eaux usées de Oued Boumerzoug car dans cette zone, il existe moins de populations, donc moins de rejets et moins de pollutions, comparativement à Oued Rhumel.

La présence d'*Aeromonas hydrophila* dans la STEP d'Ibn Ziad s'explique par le fait que c'est une bactérie qui colonise les milieux aquatiques, elle est fréquemment observée dans les eaux des stations de traitement, dans les lacs et les rivières polluées notamment dans les eaux usées. Sa présence est favorisée également par un temps pluvieux. Cependant cette bactérie cause des gastro-entérites. D'autres études de Boufercha et Benmalek (2017) faites sur cette station, ont confirmé la présence de *V. cholerae* non O1 et ceci uniquement après une forte pluie portant plusieurs microorganismes.

L'absence des vibrions dans les prélèvements (A) et (D), s'explique par les conditions défavorables des milieux (temps sec), ce qui induit la population des vibrions à acquérir un état de bactéries viables mais non cultivables.

Conclusion

L'eau usée est considérée comme un véhicule pour de nombreux germes pathogènes qui entraînent des maladies hydriques, notamment le choléra. Cette maladie historique, est réputée pour être un fléau qui a ravagé le monde durant une longue période, dont l'agent responsable est *Vibrio cholerae*. L'émergence des épidémies de choléra est donc la résultante complexe des interactions entre un agent pathogène, une population sensible et l'environnement.

Le présent travail a comme objectif principal, la recherche des *V. cholerae* dans les eaux usées, afin de les isoler puis de les identifier, par les méthodes bactériologiques classiques de diagnostic de la bactérie et d'estimer le degré de contamination des eaux usées.

Du point de vue bactériologique, parmi les cinq prélèvements qui ont été analysés durant notre stage du 15/02/2020 au 19/03/2020, pratiqué dans des conditions bien contrôlées au niveau du laboratoire d'hygiène de la Willaya de Constantine. Nous avons pu confirmer d'une part, la présence de deux souches de *Vibrio* uniquement dans deux échantillons prélevés successivement de Oued Boumerzoug et de Oued Rhumel qu'on soupçonne être les (NAG). D'autre part, la présence d'une autre souche qui est probablement *A. hydrophila* dans la STEP d'Ibn Ziad. Ces souches identifiées sont la cause d'infections bénignes, comme la gastro-entérite et ne peuvent être de loin responsable des épidémies du choléra.

L'étude du profil de sensibilité des deux souches de *Vibrio* aux antibiotiques, nous a révélé un taux de sensibilité vis-à-vis de la Colistine.

Les résultats collectés au cours de notre étude, font apparaître que les eaux usées dans les trois zones étudiées, sont un environnement favorable pour la prolifération des bactéries pathogènes et sont effectivement à l'origine des maladies hydriques, qui présentent un danger sur notre secteur sanitaire. En effet, nos résultats confirment les données de l'OMS concernant l'absence des cas du choléra dans la Wilaya de Constantine.

Jusqu'à ce jour, le cholera reste à l'échelle mondiale une menace pour la santé publique et un indicateur d'insalubrité et de sous-développement social. C'est une maladie de la misère, et de la surpopulation qui touche principalement les pays des populations pauvres. Notons que la prévention est un des piliers de la lutte contre cette maladie, qui repose sur les mesures d'hygiène individuelle et collective.

Le travail que nous avons réalisé dans le cadre de ce mémoire, et les résultats qui en découlent, ouvrent de nombreuses perspectives résumées comme suit :

- Elargir l'éventail des recherches, en fixant plusieurs points de prélèvements dans une période plus longue, en choisissant les zones les plus polluées entourées des industries et des bidonvilles, des zones où les besoins en eau potable et en assainissement ne sont pas assurés.
- Etendre notre étude sur d'autres eaux, notamment les eaux marines, saumâtres, et estuariennes.
- Choisir les périodes de recherches du *V. cholerae* entre, la fin de l'été et le début de l'automne, car ceci crée un environnement favorable et augmente la survie de la bactérie.
- Pratiquer tous les tests biochimiques complémentaires sur des galeries biochimiques API 20 E ou API 20 NE, pour la mise en évidence de tous les caractères des vibrions et aussi poursuivre les tests d'agglutinations afin de déterminer les sérotypes de *V. cholerae*.
- Approfondir les recherches en utilisant des méthodes moléculaires comme exemple : PCR, extraction d'ADN etc.

Références bibliographiques

- Adour L., Laribi-Habchi H., Arbia Khatraoui W.** (2018). Traitement des eaux usées. Ben Aknoun – Alger : OPU, p.5.
- Afri-Mehennaoui F.Z., Mehennaoui S.** (2004). Comparaison de trois techniques d'extraction pour la détermination des éléments traces métalliques dans les sédiments de l'Oued Rhumel et son affluent l'Oued Boumerzoug en zone urbaine (Constantine). Sciences et Technologie. n°21, p.29–38.
- Agence Nationale sur la Protection de l'Environnement (A.N.P.E).** (1996). Document interne, p.55.
- Alaoui Mdaghri R.** (2019). Le choléra, Un fléau toujours d'actualité : Surveillance épidémiologique et riposte. Thèse doctorat en médecine. Maroc-Rabat : Université Mohammed V, p.25-26-123.
- Alexandre O., Boutin C., Duchène P., Lagrange C., Lakel A., Liénard A., Orditz D.** (1998). Filières d'épuration adaptées aux petites collectivités. Document technique. France, p.26-27.
- Arteaga M., Velasco J., Rodriguez S., Vidal M., Arellano C., Silva F., Carreño L.J., Vidal R., Montero D.A.** (2020). Genomic characterization of the non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain that caused a gastroenteritis outbreak in Santiago, Chile, 2018. Microbial Genomics, p.8.
- Audry P., Gauzère B.** (2020). Choléra actualité 2019. Institut de médecine tropicale. Université de Bordeaux, p.1-4.
- Aubry P., Gauzère B.** (2012). Les maladies liées à l'eau. Actualités 2011. Méd. Trop., p.7.
- Banouh M., Djenane S.** (2017). Caractérisation des sous-produits de l'épuration pour une éventuelle valorisation. Mémoire : Génie hydraulique. Bouira : Université Akli Moand Oulhadje, p.11-12.
- Baumont S., Camard J.P., Lefranc A., Franconi A.** (2004). Réutilisation des eaux usées: risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France. Rapport ORS, p.11-17.
- Berche P.** (2003). Bactériologie systématique. Les bactéries des diarrhées aigues. Faculté de médecine Necker-Enfant malade, p.44-47.
- Berrato L.** (2018). L'Algérie malade du Choléra. Alger. Article .Orient xxi.

- Bertholom C.** (2019). Infections à vibrions non cholériques : manifestations cliniques et diagnostic microbiologique, Vol. 29, n° 603-604, p.21-23.
- Bompangue Nkoko D.** (2009). Dynamique des épidémies de choléra dans la région des grands lacs africains: cas de la République Démocratique du Congo. Thèse de doctorat : Sciences de la vie et de la sante. Université de Franche-Comté, p.43.
- Bonhomme A.J.C.** (2003). Les bactéries du genre *vibrio* et la santé publique vétérinaire. Thèse de doctorat : vétérinaire. Créteil : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, p.11.
- Boufercha O., Benmalek S.** (2017). Evaluation des paramètres physico-chimiques, bactériologiques des eaux usées de la station d'épuration d'Ibn Ziad et recherche de *Vibrio cholerae*. Mémoire de Master : Microbiologie Générale et Biologies Moléculaire des Microorganismes. Constantine : Université des frères Mentouri, p.60-61-62.
- Boutin J.P., Pages F., Migliani R., Chaignat C.L., Ivanoff B.** (2001). Actualités du choléra à l'aube du millénaire. *Med. Trop.*, 61, p.513-520.
- Cheryl A. Bopp, M.S., Allen A. Ries, M.D., M.P.H., Joy G. Wells, M.S.** (2002). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra : Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, p.89.
- Chouini A., Tabouche KH.** (2013). Bactériologie des fientes des Hirondelles dans la région de Guelma. Mémoire Master. Guelma : Université 4 Mai 1945, p.40-43.
- Clave D.** (2010). Fiche technique _ Bactériologie. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU. Toulouse, p.3.
- Clemens J.D., Nair G.B., Ahmed T., Qadri F., Holmgren J.** (2017). Cholera. *Lancet* ; 390, p.1540-1541.
- Daniels N.A., Shafaie A.** (2000). A review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians. *Infect.Med.* 17 (10), p.665-685.
- Daoudi N.** (2017). Le choléra, thèse de doctorat en pharmacie. Rabat, université Mohammed V-RABAT, p.21, 27,77.
- Delarras C.** (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire: Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Paris : Edition Lavoisier, p.683-716.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire. Paris : Edition TEC & DOC, p.476.

Denis F., Bingen E., Martin C., Ploy C.M, Quentin R. (2012). Bactériologie médicale : Techniques usuelles. 2^{ème} édition. Elsevier Masson, p.92.

Diakite A., Mounkoro P. (2015). Recherche et Etude de *Vibrio cholerae* dans les eaux usées de l'Oued Boumerzoug. Mémoire de Master : Microbiologie Générale et Biologies Moléculaire des Microorganismes. Constantine : Université des frères Mentouri, p.43-44.

Dunoyer J. (2013). Lutter contre le choléra ! Le rôle des secteurs EAH et SMPS dans la lutte contre le choléra. ACF-International manuel pratique. Paris, France, p.5, 16.

Dupeyron C. (1997). Examen bactériologique des selles. Développement et Santé, n° 128, (Page consultée le 15/03/2020).

<https://devsante.org/articles/examen-bacteriologique-des-selles>.

EL Marrakchi S. (2012). Les vibrions pathogènes chez l'homme : Etude bibliographique. Thèse de doctorat en pharmacie. Rabat : Université Mohammed V, p.3, 33, 24-27

Euzeby J. (2007). Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants. Document de l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse, p.20.

Farmer J., Janda M. (2015). Vibrionaceae Véron 1965. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. American Cancer Society, p.1-5.

Fouche D. (1993). Bactéries pathogènes indigènes des eaux estuariennes : cas des vibrions. Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral, p.4, 15, 14-21

Fournier J.M., Quilici M.L. (2007). Choléra. Presse. Med. 36: 727-739.

Fournier J.M., Quilici M.L. (2002). Infections a vibrions non cholériques. Encyclopédie. Médecine Chirurgie. Paris. Elsevier. SAS, p.15-17.

Gallut J., Giuntini J. (1963). Etude de *Vibrio cholerae* au microscope électronique et relation entre l'aspect morphologique et l'agglutination «O». Bulletin of the World Health Organization, Vol 29, p.768.

- Gay M.** (2004). Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. Thèse de doctorat. France : Université de la Rochelle - France, p.174.
- Géo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner** (2012). Vibrios, Campylobacters, Helicobacter, and Associated Bacteria. In : McGraw-Hill. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology. 26th edition, p.256.
- Gérard M.M.** (2003). Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologique. Rapport sur la qualité de l'eau et de l'assainissement en France. Assemblée nationale, p.15.
- Ghizellaoui S.** (2010). Evaluation de la qualité des ressources en eau alimentant la ville de Constantine. Thèse de magister : Chimie analytique et traitement des eaux. Constantine, p.13-24.
- Guegan, J.F.** (2006). Quantification des risques d'émergence d'épidémies à choléra dans le bassin méditerranéen en relation avec le changement climatique. Centre National De la Recherche Scientifique, Rapport du Ministère Français de l'écologie et du développement durable, Montpellier-France, p.13.
- Guevart E., Noesk J., Solle J., Essomba J.M., Mbondji E., Bita A. et Coll.** (2006). Déterminants du choléra à Douala.Med., Vol 66, p.283-91.
- Hacene H.** (2016). Microbiologie de l'environnement : éditions Houma. Microbiologie fondamentale et appliquée. Tome II. Alger : HOUMA, p.621-678.
- Hayette M.P, Huynen P., Meex C.** (2010). Travaux pratiques de microbiologie générale. Belgique : Université de Liège, p.31-32.
- Helsens N.** (2018). Etude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche. Thèse de doctorat en pharmacie. France : Université de Rennes 1, p.18.
- Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R.** (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl Environ Microbiol, Vol 45, p.275-283.

- Janny T.** (2004). Epidémie de choléra en Afrique : Analyse d'une étiologie multifactorielle. Mémoire : ingénieure en génie sanitaire : CPE-LYON, p.6, 18, 25-27.
- Kherifi W., Bekiri F.** (2017). Les maladies à transmission hydrique en Algérie. Journal Algérien des Régions Arides. CRSTRA. N° 14, p.76.
- Labreuche Y.** (2006). Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat : Microbiologie. Brest : Université de Bretagne Occidentale - Ecole Doctorale des Sciences de la Mer, p.9-11, 19-40.
- Lavallée M.** (2001). Les déterminants du choléra. Développement et Santé, n° 152.
- Lesne J., Fournier J.M.** (1998). *Vibrio* in «Manuel de Bactériologie Alimentaire». Polytechnica. Paris, p.308.
- Marie-Eve Val.** (2008). Etude du système de résolution des dimères de chromosome chez *Vibrio cholerae* – Implication dans le contrôle de la lysogénie du phage CTX ϕ codant pour la toxine cholérique, thèse de doctorat : Paris XI : université Paris sud XI, p.80-85.
- Melin P.** (2018). Choléra. Fiche informative du centre Hospitalier Universitaire de Liège, p.5-6.
- Mitze D., Podovic T., Blako P.A.** (1994). Transmission de *Vibrio cholerae* O : 1. *Vibrio cholerae* and cholera : Molecular to global perspectives. American .society .for Microbiology. Washington DC, Vol 2, p.57-63.
- Morillon M., Garnotel E.** (2004). Choléra. EMC- Maladies Infectieuses, p.67-80.
- Morsly T.** (1886). De L'Epidemie Cholérique qui a sévi aux environs Constantine. Constantin: Imprimerie Adolphe Braham, 4, Rue du Palais, p.1-39.
- Mouffok F.** (2008). Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson, Manuel des travaux pratiquent des eaux. Institut Pasteur d'Algérie, p.53.
- Muyldermans G.** (2016). *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*. Demande de test : Détermination du séro groupe et du sérotype *Vibrio cholera* .Travaux pratiques. Belgique : Université de Liège.
- Nishiguchi M., Jones B.** (2004). Microbial biodiversity within the Vibrionaceae: Joseph Seckbach. Origins genesis, evolution and diversity of life. London : Kluwer Academic

Publishers, p.533-547.

Olson D., Fesselet J.F., Grouzard V. (2018). Management of a Cholerae Epidemic. Guide Clinique : Principes de prise en charge.

OMS. (2019). Choléra, 2018. Relevé épidémiologique hebdomadaire, 94 (48), p.561–580.

OMS (2018). Le choléra. Normes de surveillance des maladies évitables par la vaccination, p.3.

OMS (2004). Choléra .Relevé épidémiologique hebdomadaire, Vol 80, p.261-268.

OMS (1992). Prise en charge du cholérique. Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, p.2.

Piarroux R. (2002). Le choléra : épidémiologie et transmission. Expérience tirée de plusieurs interventions humanitaires réalisées en Afrique, dans l’Océan Indien et en Amérique centrale. Bull.soc.Phats.Exot., Vol 95, p.345-350.

Pollitzer R. (1960). Le Cholera Organisation mondiale de la Sante: Série de Monographies, No 43. Genève, p.21, 107, 549-628.

Quilici M.L. (2011). Le diagnostic bactériologique du choléra. Revue Francophone des Laboratoires, Les maladies tropicales (2). n°431, p.51-65.

Quilici M.L., Robert-Pillot A. (2011). Infections à vibrions non cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Maladies Infectieuses ; 8-026-F-15.

Raoui F. (2019). Journée sur les maladies à transmission hydrique à Constantine : Contrôler tous les points d’eau. El Watan.

Reed B. (2014). Prévention de la transmissions des maladies féco-orales. WEDC, université de Loughborough, p.8.

Rémy G., Dejours H. (1988). L'Africanisation du choléra. Persée, Les Cahiers d'Outre-Mer 41-162, p.105-138.

Sinclair D., Abba K., Zaman K., Qadri F., Graves P.M. (2011). Oral vaccines for preventing cholera. Cochrane Database of Systematic Reviews.

Sudre B., Goff N. (2011). Mode opératoire: Recherche de *Vibrio Cholerae* dans l’environnement hydrique. n°1, p.28.

Traore O.M. (2008). Aspects Epidémiologiques du Choléra dans le district sanitaire de Kayes. Thèse doctorat en médecine. Kayes : Université de Bamako, p.35-36.

UNICEF (2013). Guide pratique de lutte contre le choléra, p.21, 14.

Vezzulli L., Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R. (2010). Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. Environ Microbiol Rep 2. (1), p.27–33.

Zhang X.H., Austin B. (2005). A review haemolysins in *Vibrio* species. Japan Applied Microbiology, Vol 98, p.1011-1019.

Annexes

Annexe 01 : La composition des milieux de culture (g/l).**Gélose Nutritive Alcaline biliée (GNAB) (g/l)**

Peptone de viande.....	10
Extrait de viande.....	3
Chlorure de sodium.....	5
Bile de bœuf desséchée.....	2
Agar.....	18
pH 8,6	

Eau peptonée alcaline (EPA) (g/l)

	EPA	EPA 10 x cc
Protéose peptone.....	10	100
Peptone.....	10	100
Chlorure de sodium.....	5	50
pH 8.6		

Gélose TSI (Triple Sugar Agar) (g/l)

Peptone de viande.....	15
Proteose peptonée.....	5
Extrait de viande.....	3
Extrait de levure.....	3
Glucose	1
Saccharose.....	10
Lactose.....	10
Citrate de Fer ammoniacal.....	0,3
Chlorure de sodium.....	5
Sodium thiosulfate.....	0,3
Rouge de phénol.....	0,05
Agar.....	18
pH 7,4	

Milieu Mannitol-mobilité (g/l)

Peptone de viande.....	15
Extrait de viande	3
Mannitol.....	10
Potassium nitrate.....	1
Rouge de phénol	0,05
Agar.....	5
pH 7,8	

Milieu Citrate de Simmons (g/l)

Ammonium dihydrogenophosphate	1
Phosphate dipotassique	1
Chlorure de sodium	5
Citrate de sodium.....	2
Sulfate de magnésium	0,2
Bleu de bromothymol	0,08
Agar.....	18
pH 6,6	

Milieu de Mueller Hinton (g/l)

Extrait de viande.....	3
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5
Agar.....	16
pH 7,3	

Milieu urée-indole (g/l)

L-tryptophane	3
Urée	20
Monophosphogénophosphate de potassium	1
Dihydrogénophosphate de potassium	1

Chlorure de sodium	5
Ethanol à 95°	10
Rouge de phénol en solution à 1 %	2.5
pH 6.8	

ODC (g/l)

Extrait de levure	3
L-ornithine (monochlorhydrate)	5
Glucose	1
Bromocrésol pourpre	0.16
Ethanol	1
Chlorure de sodium	5
pH 6.8	

ADH (g/l)

Extrait de levure	3
L-arginine (monochlorhydrate)	5
Glucose	1
Bromocrésol pourpre	0.16
Ethanol	1
Chlorure de sodium	5
pH 6.8	

LDC (g/l)

Extrait de levure	3
L-lysine (monochlorhydrate).....	5
Glucose	1
Bromocrésol pourpre	0.16
Ethanol	1
Chlorure de sodium	5
pH 6.8	

Bouillon cœur-cervelle (g/l)

Protéose-peptone	10
Extrait de cervelle	12.5
Extrait de cœur	5
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de sodium	2.5
pH 7.4	

Annexe 02 : Réactifs utilisés**Réactif de la recherche d'oxydase (OX)**

Disque imprégnés d'une solution à 1% de chlorydrate de Tetraméthylparaphénylène-diamine

Réactif de Kovacs

Para-dimethyl -amino-benzaldéhyde	7g/l
Alcool isoamylique	75 ml
Acide chlorhydrique concentré	20 ml

Solution de l'eau oxygénée à 10 %

Eau oxygénée à 10 V.....	0, 5ml
Eau distillée	14,5ml

Disque ONPG

Disque de papier filtre stérile imprégné de tampon et de l'ortho-nitro-phényl- galactoside

Annexe 03 : Coloration de Gram et examen a l'état frais

Coloration de Gram

Préparation du Frottis :

1. Étalement : Déposer une goutte d' H_2O sur une lame propre puis Prélever une colonie à l'aide d'une anse de platine stérile et la frotter dans la goutte en réalisant un étalement en couche mince.
2. Séchage : Laisser sécher à l'air. Sécher à l'aire libre le frottis.
3. Fixation : Passer la lame dans la flamme du bec Bunsen pendant quelques secondes pour fixer l'échantillon à la chaleur.

La Coloration :

1. Coloration primaire : Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé. Laisser agir 1 minute puis Rincer à l'eau distillée.
2. Mordançage : Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries. Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.
3. Décoloration à l'alcool : Verser quelque goutte l'alcool sur la lame et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Rincer à l' H_2O .
4. Contre coloration avec de la Fuchisine : Recouvrir la lame de Fuschine, laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau.
5. Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher.

Examen a l'état frais

1. Déposer une gouttelette de l'eau stérile sur une lame propre.
2. Prélever une fraction de colonie sur le milieu de culture gélosé à l'anse de platine stérile.
3. Émulsionner très délicatement (afin de ne pas casser les flagelles) de façon à obtenir une suspension homogène.
4. Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Ecologie et environnement

Spécialité : Ecologie microbienne

La recherche de *Vibrio cholerae* dans les eaux usées de Oued Bumerzoug, Oued Rhumel et la STEP d'Ibn Ziad

Résumé

Le choléra est une maladie diarrhéique, contagieuse strictement humaine, dont l'agent pathogène est une bactérie à Gram négatif, appartenant aux sérogroupes O1 ou O139 de l'espèce *Vibrio cholerae*,

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Constantine, durant une période allant du 15/02/2020 au 19/03/2020. Elle a porté sur cinq prélèvements d'eaux usées prélevées dans Oued Rhumel, Oued Bumerzoug et dans la STEP d'Ibn Ziad. Le but de cette étude, est la recherche et l'identification des vibrions cholériques dans ces eaux. Nous avons utilisé les méthodes bactériologiques classiques, de diagnostic de la bactérie. Ces méthodes reposent sur l'enrichissement, sur eau peptonée alcaline, un isolement sur milieu sélectif GNAB et une identification par des caractères biochimiques.

Les principaux résultats de notre travail de recherche, ont révélé la présence de deux souches de *Vibrio*, réparties successivement dans Oued Bumerzoug (B) et Oued Rhumel (C) qui se sont avérées des (NAG). On note également, une sensibilité de ces souches de *Vibrio* à la Colistine. Nos résultats ont aussi révélé, la présence d'une troisième souche dans la STEP d'Ibn Ziad (E), qui appartient au genre *Aeromonas* et qu'on la rapproche de l'espèce *A. hydrophila*.

Mot clés : Choléra, *Vibrio cholerae*, eaux usées, Oued Rhumel, Oued Bumerzoug, STEP d'Ibn Ziad, méthodes bactériologiques.

Membre du jury :

Président du jury : Bouzeraib Latifa (Maître-Assistante « A » - UFM Constantine).
Rapporteur : Chabbi Rabah (Maître-Assistant « A » - UFM Constantine).
Co-encadreur : Khelifa Foudil (Maître de conférences « A » - Faculté de médecine).
Examineurs : Guergouri Ibtissem (Maître-Assistante « A » - UFM Constantine).

Présentée par :
Belbekri Raounek
Abderrahim Nassima Ines

Année universitaire : 2019 -2020