



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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 علوم الطبيعة والحياة

**Département de Microbiologie**

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes**

Intitulé :

---

**Recherche et Etude de *Vibrio cholerae* dans les eaux  
usées de l'Oued Boumerzoug**

---

**Présenté et soutenu par : DIAKITE Amadou**

**Le :28 /06/2015**

**MOUNKORO Pierre**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme RIAH N. (MCB- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mme BOUZERAIB L. (MAA- UFM Constantine).

**Examineur :** Mme BOUBEKRI K. (MCA- UFM Constantine).

*Année universitaire*  
**2014 - 2015**

## Résumé

Les eaux usées constituent un milieu aquatique rassemblant l'essentiel des rejets domestiques. Les eaux usées constituent donc un réservoir important pour la prolifération des microorganismes. Sa constitution en microorganismes pathogènes peut renseigner sur la persistance de ces derniers dans la population.

*Vibrio cholerae* est une bactérie aquatique pathogène pouvant être retrouvée au niveau des eaux usées.

Responsable du choléra, maladie pandémique, *Vibrio cholerae* peut persister dans l'environnement aquatique. Dans les conditions favorables, elle pourra déclencher une épidémie.

Notre travail s'inscrit dans la recherche de la bactérie dans les eaux usées de l'Oued Boumerzoug, les résultats nous renseigneront de l'état de la bactérie dans les eaux usées de l'Oued.

La bactérie a ainsi été recherchée selon la méthode conventionnelle de la recherche de *Vibrio cholerae* dans un laboratoire de bactériologie.

Nos résultats rapportent une absence de la bactérie dans les prélèvements effectués.

Ce résultat a ainsi été en concordance avec les travaux déjà réalisés qui stipulent que les caractéristiques climatiques et géographiques de l'Oued Boumerzoug ne favorisent pas la survie de *Vibrio cholerae*.

Ainsi, les données de l'OMS concernant l'absence des cas de choléra en Algérie (donc absence de cas à Constantine) peuvent être affirmées.

**Mots Clés :** *Vibrio cholerae*, choléra, Oued Boumerzoug, Eaux Usées, Isolement

## Abstract

The wastewater is an aquatic environment bringing together the essential domestic waste sewage.

The waste water constitutes thus an important source for the growth of microorganisms specially the pathogens ones.

*Vibrio cholera* is an aquatic pathogenic bacterium that can be found in wastewater.

Responsible of cholera, pandemic disease, under the favorable conditions it may causes an outbreak

our work is a part of a research about the bacterium in the wastewater of Oued Boumerzoug.

The bacterium has been researched according to the conventional methods in a bacteriology laboratory.

Our results show the absence of the bacterium in the analyzed samples

these results are compatible with the other works already done which stipulate that the climatic and geographic characteristics do not favor the growth of *Vibrio cholerae*

Thus, the WHO data of the cholera in Algeria can be affirmed.

Keywords: *Vibrio cholerae*, cholera ,Oued Boumerzoug , wastewater ,Isolation.

## ملخص

تشكل المياه الراكدة تجمعا للمياه العكرة وتعتبر مجمعا هاما لتكاثر الكائنات الدقيقة وخاصة الممرضة منها. *Vibrio cholerae* هي بكتريا ممرضة تعيش في المياه الراكدة وهي المسؤولة عن مرض الكوليرا عند توفر الظروف الملائمة وقد تسبب *Vibrio cholerae* في انتشار الوباء.

يدخل هذا العمل في اطار البحث عن هذه البكتريا في مياه واد بومرزوق وفق الطرق المعتمدة في المخابر البكتريولوجية، حيث اظهرت التحاليل غياب هذه البكتريا في العينات المدروسة ، هذه النتائج تتوافق مع بعض البحوث التي تنص على الخصائص المناخية والجغرافية لهذا الواد غير الملائمة لنمو هذا النوع من البكتريا ، وعليه معطيات منظمة الصحة العالمية حول غياب حالات الإصابة بالكوليرا في الجزائر مؤكدة علميا.

الكلمات المفتاحية : *Vibrio cholerae*، المياه العكرة، واد بومرزوق، تحديد.

## **Remerciements**

*Nous remercions DIEU tout puissant de nous avoir donné le courage de mener à terme ce travail.*

*Nous souhaitons adresser nos vifs remerciements aux personnes qui nous ont aidées et qui n'ont ménagé aucun effort dans l'élaboration de ce présent travail.*

*Tout d'abord notre encadreur Mme BOUZERAIB L. qui excelle en tout point dans l'assistance des étudiants et dont l'encadrement nous a été une aide exceptionnelle.*

*La présidente du jury Mme RIAH N. d'avoir accepté de présider le jury.*

*Mme BOUBEKRI K. d'avoir bien voulu juger notre travail.*

*Nous remercions aussi Notre pays, le Mali, qui a bien voulu nous accorder cette bourse d'étude. Nos plus sincères gratitude vont vers ce beau pays, l'ALGERIE, qui nous a accueillis et suivi tout au long de notre parcours.*

*Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, nos amis, nos camarades ainsi que tous ceux qui nous ont toujours soutenus et encouragés au cour de la réalisation de ce mémoire. Nous n'oublions pas Mme ZOGHMAR S. pour son assistance dans le laboratoire de bactériologie N°11 de la Faculté.*

*Pierre et Amadou*

## *Dédicaces*

Je remercie le tout Miséricordieux de nous avoir relever à chaque moment et de nous avoir donné la chance de réaliser ce travail.

Avec tous mes vœux de bonheur, santé, prospérité, je dédie ce mémoire :

A ma très chère mère Traoré Hawa qui ne cesse de faire bénédiction jour et nuit à moi et mes camarades durant ces cinq ans.

A mon défunt père Lassana qui saurait fier là où il est pour mon accomplissement à ce grade (que la paix soit sur son âme et sur ceux de tous les défunts).

Je le dédie à mon très cher professeur M. Maiga Issoufi, enseignant de biologie au lycée Askia Mohamed de m'avoir dispensé gratuitement vos cours privé, votre bonté me fait toujours chaud au cœur.

J'adresse également ma reconnaissance à toute ma famille pour leur soutien depuis toujours.

A mon frère aîné Diakité Cheick Oumar qui a été un père pour nous, je n'oublierai jamais qu'il vous a été toujours impossible de me dire non à une chose. A mon frère Ousmane pour tous tes conseils.

A notre benjamin Tièmoko, le plus cool et le plus chouchou ; toutes mes bénédictions pour toi. A Abdoul Wahab.

Je le dédie à mes sœurs adorées, les plus belles et les plus charmantes, à Oumou à Fatoumata Fatim notre mère, merci Kadiatou pour tout ce que tu as fait pour moi, ah Assitan ma sœur précieuse, vos chemises et vos body m'habillent toujours et tous ces bazins, ils sont toujours en top. A mes frères Ahmadi et Adja.

A ma cousine chérie Traoré Aminata Amicoroba depuis Medina-coura.

Un très grand merci à toutes (tes) mes amies) s qui m'ont accompagné pendant toute cette période (Djene, Djelika , Nostra Damis, ...)

Une ligne infinie de reconnaissance à mon chou, ma bien aimée, ma confidente Mlle. Tall Araba ma doliprane, pour ta présence ton soutien et toutes ses considérations).

A mes amis d'enfance Madson, Sylla Boubacar, Laye ...

Comment ne pas le dédié à la promotion 2010, à mes très chers amis de Mentouri,

*DIAKITE Amadou*

## *DEDICACES*

*Je remercie Dieu tout puissant qui m'a guidé dans toutes mes démarches et qui me soutient aujourd'hui et pour toujours.*

*Je dédie ce mémoire à mes parents (Didier Mounkoro et Kadiatou Traoré) , mes grands-parents ( Pierre Mounkoro, Martine Coulibaly , Mah Diallo ,Bintou Traoré ) et mes frères qui ont toujours été à mes côtés dans tous mes projets.*

*Je remercie mes amis "ma fraternité " ; Bamba Salia, Coulibaly Oumar , Diakité Amadou , Soumaoro Idrissa pour leurs soutiens immense et pour les plus beaux moments qu'on a passé ensemble .*

*J'aimerais particulièrement remercier ma bien –aimée Mlle Diakité Aïssata pour sa patience, son encouragement et ses conseils.*

*Enfin, mes plus grands remerciements à tous ceux qui m'ont soutenu.*

*MOUNKORO Pierre*

# Table des Matières

INTRODUCTION .....	1
BIBLIOGRAPHIE	
I- <i>Vibrio cholerae</i> .....	2
I-1-Historique.....	2
I-2-Ecologie de la Bactérie.....	2
I-3- Caractères Bactériologiques.....	3
I-3-1- Caractères morphologiques.....	3
I-3-2- Caractères Cultureux.....	4
I-3-3- Caractères Biochimiques.....	6
I-3-4- Caractères Antigéniques.....	6
I-3-5- Caractères Génomiques.....	8
I-4- Classification de <i>Vibrio cholerae</i> .....	8
I-5- Isolement et Identification.....	11
I-5-1- Isolement de <i>Vibrio cholerae</i> .....	11
I-5-2 Identification de <i>Vibrio cholerae</i> .....	12
I-6- Pouvoir pathogène et Virulence.....	15
I-6-1- Pouvoir Pathogène.....	15
I-6-2- Virulence de <i>V. cholerae</i> .....	18
II- Bases Moléculaires de l'antibiorésistance chez <i>Vibrio cholerae</i> .....	23
II-1- Antibiotique.....	23
II-1- 1-Définition.....	23
II-1- 2- Mode d'action des antibiotiques.....	23
II-2- Mécanismes de résistance.....	24
II-2-1- Mécanisme de résistance innée ou Naturelle.....	24

II-2-2-Mécanisme de résistance Acquise.....	25
II-3-Antibiorésistance chez <i>Vibrio cholerae</i> .....	26
II-3-1-INTEGRON.....	26
II-3-2-ELEMENTS CONJUGATIFS INTEGRATIF.....	26
II-3-3-Les PLASMIDES.....	27
II-3-4-LES BETA-LACTAMASES A SPECTRE LARGE.....	27
III-EPIDEMIOLOGIE DU CHOLERA.....	27

## Matériels et Méthodes

I-Matériel.....	32
II-1-Matériels Utilisés.....	32
I-3-MILIEUX DE CULTURE .....	32
II-4-Réactif.....	33
II-METHODE.....	33
II-1- Lieu de prélèvement.....	34
II-2- Période de prélèvement.....	34
II-3- Transport des prélèvements.....	34
II-4-Enrichissement, isolement et identification.....	34
II-4-1-Enrichissement.....	34
II-4-2-Isolement et identification.....	34

## RESULTATS

I-Enrichissement.....	37
II-Aspects culturels.....	37
II-1-Aspect Macroscopique .....	37
II-2-Aspect Microscopique.....	38
III-Test de l'oxydase.....	38

IV-Test de la Catalase.....	38
V-Recherche des Décarboxylases.....	39
VI-Test de Nitrate Réductase.....	39
VI-Test Mannitol Mobilité.....	40
VIII-Identification par Galerie Api20E.....	41

#### Discussion et Interprétation

Discussion et Interprétation.....	43
-----------------------------------	----

#### conclusion

Conclusion.....	45
-----------------	----

#### *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

#### *ANNEXES*

## Liste des abréviations

ACE : Accessory cholera enterotoxin

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADH : Arginine dihydrolase

Ag : Antigène

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide Ribonucléique

att : Site d'attachement au niveau de l'intégron

CS : Citrate de Simmons

CTX : Cholera toxin

EP(S)A : Eau peptonée (hypersalée) alcaline

EPS : Exopolysaccharide

GEL : Gélatinase

GLU : Glucose

GM1 : Ganglioside Molécule 1

GN : Gélose nutritive

Hly : Hémolysin

H<sub>2</sub>S : Sulfure de dihydrogène

I : Intermédiaire

KDa : Kilo Dalton

IND : Indole

LAC : Lactose

LDC : Lysine décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Thermolabile

MSHA : Mannose-sensitive hemagglutinin

NaCl : Chlorure de Sodium

NIT : Nitrate réductase  
ODC : Ornithine décarboxylase  
omp : Outer membran protein  
ONPG : Orthonitrophényl—galactoside  
pH : Potentiel d'hydrogène  
PL : Polaire lophotriche  
PM : Polaire monotriche  
R : Résistance  
RTX : Repeats in toxin  
RUT : République Unie de Tanzanie  
S : Sensible  
ST : Thermostable  
TCBS : Thiosulfate —citrate- bile-saccharose  
TCP : Toxin-coregulated pilus  
TDA : Tryptophane désaminase  
TL : Taux de létalité  
toxR : gène de régulation de la toxine  
UREE : Uréase  
UV : Ultra-violet  
VP : Réaction de Voges Proskauer  
V : Variable  
ZOT : Zonula occludens toxin  
 $\mu\text{m}$  : Micro-mètre

**LISTE DES FIGURES**

- Figure 1** : Morphologie générale de *V. cholerae*
- Figure 2** : Coloration de Gram de *V. cholerae*
- Figure 3** : Culture de *V. cholerae* sur milieu liquide
- Figure 4** : Colonie de *Vibrio cholerae* sur gélose nutritive
- Figure 5** : Aspect des colonies de *Vibrio cholerae* sur le milieu TCBS
- Figure 6** : Identification biochimique de *Vibrio cholerae*
- Figure 7**:Recapitulatif de la méthode d'isolement et d'identification
- Figure 8** : Etapes de la pathogenèse de *Vibrio cholerae* (cas du choléra)
- Figure 9** : Cycle de la transmission du choléra dans l'environnement
- Figure 10** : Structure du phage CTX et de l'opéron RTX chez *v. cholerae*. Les flèches désignent le sens de la transcription
- Figure 11** : La toxine cholérique CT, expression, assemblage et excrétion
- Figure 12** : Régulation de la virulence chez *Vibrio cholerae* au niveau de la synthèse de la toxine cholérique
- Figure 13** : Mode d'action des antibiotiques
- Figure 14**: Répartition géographique du choléra dans le monde selon l'OMS
- Figure 15** : Lieu de prélèvement dans l'Oued Boumerzoug
- Figure 16** : Aspect des colonies sur milieu GNA
- Figure 17** : Aspect des colonies sur milieu TCBS
- Figure 18** : Révélation du Test d'oxydase
- Figure 19** : Résultat du Test de catalase
- Figure 20** : Résultat du test nitrate réductase
- Figure 21** : Galerie Api20E de la souche 1
- Figure 22** : Galerie Api20E de la souche2
- Figure 23** : Galerie Api20E de la souche 3
- Figure 24** : Galerie Api20E de la souche B1

**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1** : Quelques caractères biochimiques de *V. Cholerae*.

**Tableau 2** : Quelques différences fondamentales entre les deux biotypes du sérotypes O1.

**Tableau 3** : Classification de *V. Cholerae* dans le monde bactérien.

**Tableau 4** : Caractéristiques différentielles des Genres proches de vibrio.

**Tableau 5** : Caractéristiques différentielles des espèces de vibrio couramment retrouvées dans les échantillons cliniques.

**Tableau 6** : Répartition mondiale des cas de choléra.

**Tableau 7** : Résultats du test des Décarboxylases.

**Tableau 8** : Résultat du test Mannitol -mobilité



***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

Dans la diversité du monde vivant les microbes sont de loin les plus répandus .Parmi les microbes, les bactéries constituent un groupe extrêmement varié, et les protéobactérie sont ceux ayant de plus d'Interaction avec l'homme. [2]

Les eaux usées constituent un milieu aquatique rassemblant l'essentiel des rejets domestiques. Par leur richesse en matière organique, ils constituent un environnement favorable pour la prolifération des bactéries. [51]

*Vibrio cholerae* est une protéobactérie aquatique, oxydase positive, à Gram négatif, incurvée, ayant de d'importantes interactions avec l'environnement qu'avec l'homme. [2]

Responsable du Choléra, maladie fortement transmissible avec un taux de mortalité pouvant dépasser 50%, il constitue un véritable danger de la santé publique. Ainsi d'importants travaux ont été menés en vue de combattre le choléra. [48]

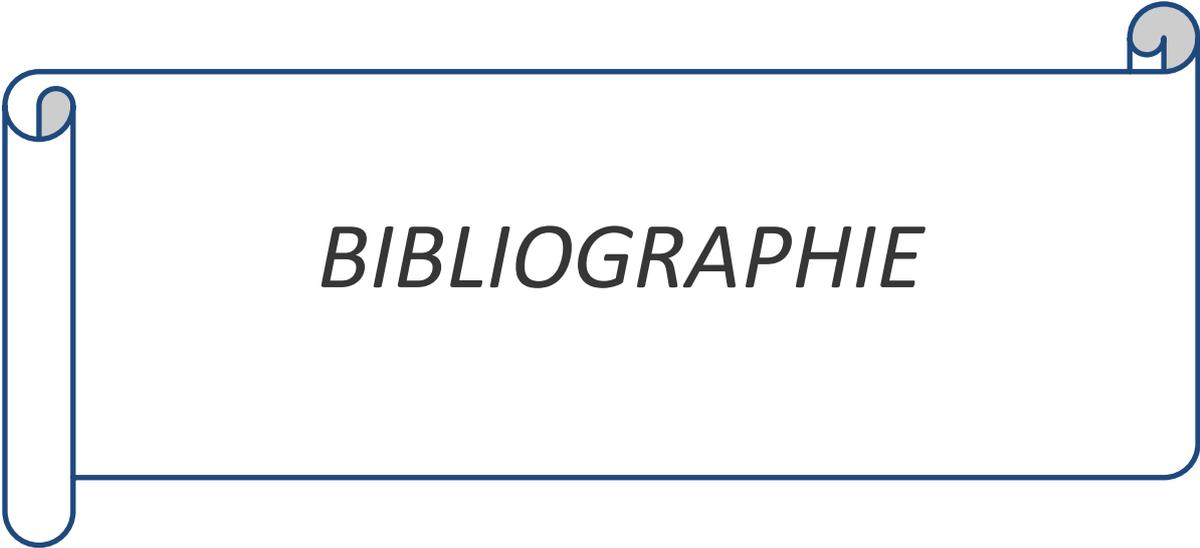
Dans les pays présentant de rare (ou absence de cas), la connaissance de l'état de la bactérie dans l'environnement est nécessaire et exige la mise en place des mesures préventives. Toutefois cette pandémie peut demeurer saisonnière et se déclencher lorsque les conditions environnementales le favorisent. [48]

Dernièrement une forte résistance des souches de *Vibrio cholera* a été observée .Ces résistances aux antibiotiques, ont un effet dévastateur de l'équilibre. [45]

Le but principal de notre travail est la recherche et l'isolement des souches de *Vibrio cholerae* dans les eaux usées de l'Oued Boumerzoug, un écosystème constituant une niche écologique.

Le second but serait de :

- Identifier les souches obtenues
- Maitriser des techniques d'identification
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées



*BIBLIOGRAPHIE*

## I-Vibrio cholerae

### I-1-Historique

Dès 1773, Otto Fridrich Muller avait observé six (6) espèces de Vibrions, 93 ans plutard vers 1863 Pasteur attribuait le processus de décomposition à six (6) types de Vibrions. Mais il revenait à Koch après observation de Pacini en 1855 de formes vibrionées dans les selles de cas cholériques, d'isoler et de rapporter la maladie cholérique à *vibrio comma*, le vibron cholérique en 1893 à Alexandrie. C'était la première maladie décrite rapportée à un vibron. Ainsi les études sur Vibrio cholérique ont servi de locomotive pour la continuité de la recherche sur le genre Vibrio et principalement l'espèce *Vibrio cholerae*. [1]

### I-2-Ecologie de la Bactérie

Le genre Vibrio est constitué d'espèces aquatiques initialement d'origine marine et dont la niche écologique est représentée par des eaux côtières et estuariennes. *Vibrio cholerae* vit librement dans l'environnement mais leur survie est accrue lorsqu'elle est associée à d'autres organismes aquatiques. L'existence d'un réservoir naturel aquatique de vibrions cholériques associés au phytoplancton et zooplancton ont été démontrée à Bangladesh. La nature de cette relation semble floue mais elle paraît être une relation commensale ou symbiotique. En effet la bactérie produit de la *Chitinase* et la mucinase. La Chitinase leur confère la capacité de vivre chez les crustacés dont la carapace est essentiellement constituée de chitine. Quant à la mucinase, celle-ci favorise leur interaction avec les algues. D'autre part l'acquisition par des souches non cholériques d'un nouveau caractère génétique (flot CTX) les a permis de coloniser l'homme et d'avoir ce dernier comme une niche écologique. [12] [30]

Leur écologie dépend d'un certain nombre de facteur ; la température de l'eau, la salinité, la disponibilité des sources de carbones et de minéraux, la disponibilité de l'oxygène ainsi que la profondeur des eaux. En effet la concentration des ions  $\text{Na}^+$  joue un rôle prédominant pour la croissance. [2], [20]

L'espèce *Vibrio cholerae* est une espèce halotolérant pouvant tolérer jusqu'à 6% de NaCl. Il se développe dans les eaux dont la température est supérieure à 15 °C, les milieux alcalins (pH>8) et salées. Il se développe aussi dans les eaux saumâtres, plutôt chaudes, mais survit aussi des années dans les eaux polluées. Elle est très sensible à l'acidité stomacale. [3]

*V. cholerae* est une bactérie dotée de capacité de résistance dans l'environnement. Il s'agit de s'adapter à certains facteurs environnementaux comme la température, le pH et la pénurie de ressources nutritives. Cette adaptation se manifeste par un état spécial, l'état de bactérie Viable non cultivable. Ces bactéries se retrouvent dans un état de dormance perdant leur capacité d'être cultivée sur milieu de culture bactériologique conventionnelle. [20]

Responsable du choléra, maladie pandémique, *V. cholerae* peut contaminer l'eau, les coquillages et poissons ou divers autres produits consommés crus (lait, légumes etc...). [4]

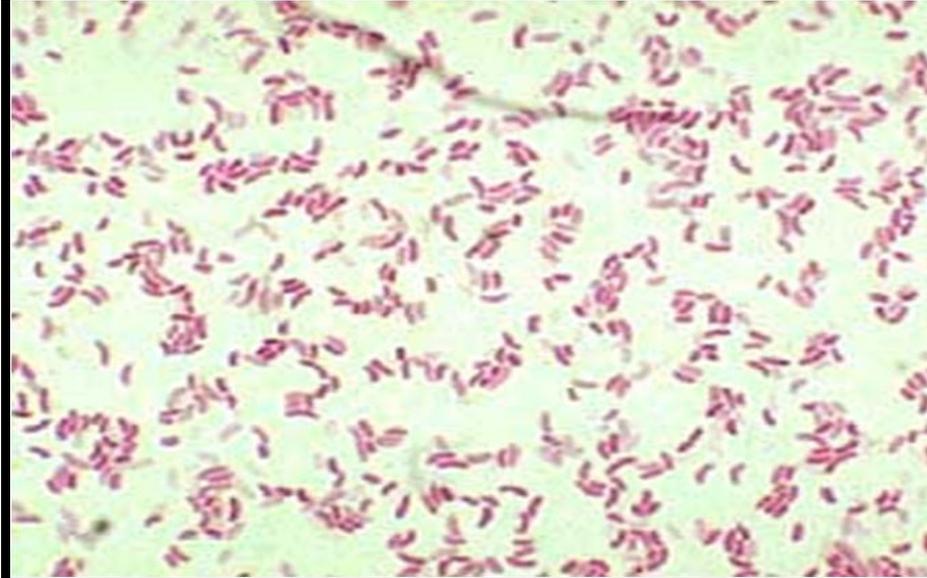
### I-3-Caractères Bactériologiques

#### I-3-1-Caractères morphologiques

*Vibrio cholerae* est un bacille Gram négatif (voir **Figure 2**) incurvé de 1,5 à 2 $\mu$ m de longueur et de 0,5 à 0,6 $\mu$ m de diamètre, asporulé. *V. cholerae* est considéré comme étant une bactérie acapsulée mais la capsule a été observée chez *V. cholerae* O139. A la surface de la bactérie le glycocalix a été observé. Ils sont mobiles par flagelles (voir **Figure 1**). Sur un milieu de culture solide, on observe des flagelles de type péritriches mais dans les milieux de culture liquide on observe un flagelle monotriche. Le flagelle polaire observable sur milieu liquide est une extension de la membrane cellulaire de 1,4 à 1,8  $\mu$ m de longueur et d'un diamètre de 24 à 30nm. Le polymorphisme a été observé chez *V. cholerae*, il est fréquent d'observer dans les vieilles cultures la formation de corps coccoïdes ou de << micro vibrions >> ; qui sont filtrable sur membrane à pores de 0.45  $\mu$ m et qui peuvent reverser vers la forme parentale dans des conditions favorables. Des fimbriae ou pili communs ont été décrits, qui aurait un rôle dans l'attachement des bactéries à la muqueuse intestinale. [5], [6], [7].



**Figure 1** : Morphologie générale de *V. cholerae* [8]



**Figure 2 :** Coloration de Gram de *V. cholerae* [9]

### **I-3-2-Caractères Cultureux**

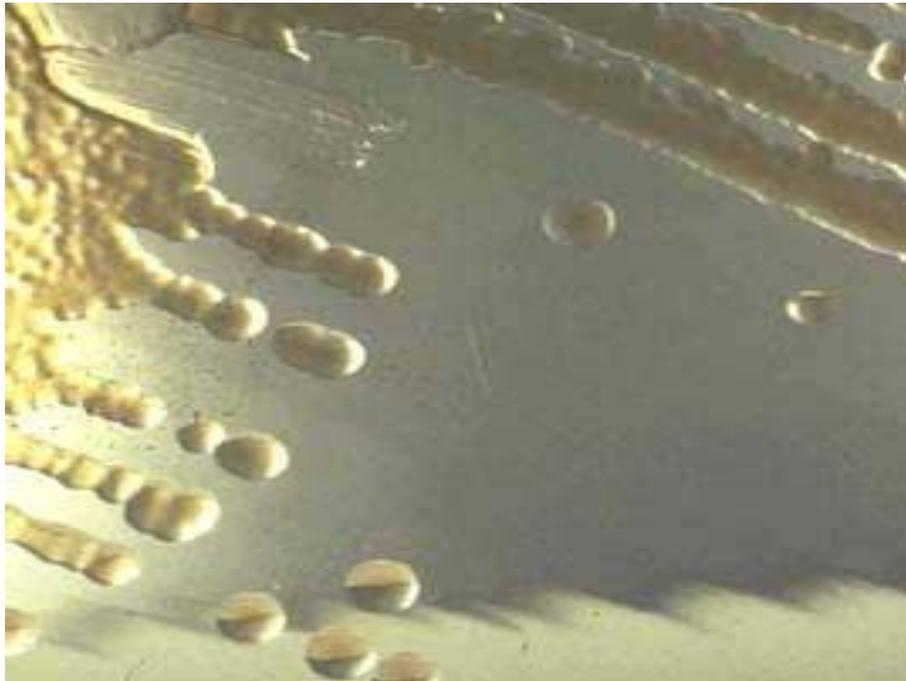
Bactérie capable de pousser dans l'eau peptonée contenant du NaCl comme dans l'eau peptonée exempte de NaCl ce qui les différencie de la plupart des espèces du genre *Vibrio*. La croissance de *V. cholerae* est très rapide dans les bouillons peptonés simples permettant une lecture après 24h de culture. On observe des ondes moirées et un voile blanchâtre très fragile en surface (voir **Figure 3**). [7].

Sur Gélose nutritive, les colonies apparaissent très rapidement en 8 -10h à 37°C. Des colonies << Smooth >>, lisses, plates, à bord régulier, 2-3mm diamètre, faiblement convexe, non irisées en transillumination oblique, brillantes, et surtout transparentes (voir **Figure 4**). [7]

Elle croit entre 30°C et 40°C avec un optimum entre 30- 37°C. Aucune croissance n'est observable en dessous de 15°C et au-delà de 42°C. Une température de 50°C leur est létale. Une de leurs caractéristiques est qu'elle se multiplie bien à pH neutre et alcalin (pH 9-10) et absence totale de croissance en dessous d'un pH acide (pH 6). La croissance optimale a été observée dans un milieu contenant 1 à 3 % de NaCl, et elle est inhibée par une concentration de 7% de NaCl. [6]. [7].



**Figure 3 :** culture de *V. cholerae* sur milieu liquide [10]



**Figure 4:** Colonie de *V. cholerae* sur gélose Nutritive [11]

### **I-3-3-Caractères Biochimiques**

Bactérie anaérobie facultative avec une forte préférence pour les milieux aérobies. L'accepteur final des électrons est alors l'oxygène. L'un des caractères les plus importants et les plus utilisés est le fait que la bactérie présente dans la chaîne respiratoire du Cytochrome-Oxydase, révélé lors du test d'oxydase. Elle fermente une grande variété de sucre sans production de gaz. L'une de ces fermentations largement utilisée surtout pour son

identification est celle du saccharose. Elle fermente le D-glucose sans production de gaz et ne fermente pas l'arabinose (voir *Tableau 1*).

*Tableau 1* : quelques caractères biochimiques de *V. cholerae*

Caractères	Oxydase	Nitrate réductase	Fermentation du saccharose	Fermentation du D-glucose	Fermentation du Lactose	Fermentation de l'arabinose	Mannitol mobilité	Arginine deshydrolyase	Lysine décarboxylase	Ornithine décarboxylase
<i>V. cholerae</i>	+	+	+	+ (gaz -)	-	-	+	-	+	+

### I-3-4-Caractères Antigéniques

*Vibrio cholerae* est une bactérie caractérisée par trois structures antigéniques. La diversité antigénique est à l'origine d'un grand nombre de sérogroupes.

-L'antigène H caractéristique du flagelle. Il est le même chez tous les sérogroupes. [2]

-L'antigène O, le plus important dans l'espèce. Actuellement on dénombre plus de 200 sérogroupes selon l'agglutination antisérum-antigène O. Le séro groupe O1, a été longuement étudié vu son importance médicale. Le séro groupe O1 est subdivisé en trois sérotypes : INABA, OGAWA et HIKOJIMA. Le sérotypes OGAWA est caractérisé par les facteurs antigéniques AB. Le Sérotypes INABA possède les facteurs AC. Quant au

troisième sérotype, HIKOJIMA, il possède les trois facteurs ABC mais a la particularité d'être rare et instable. Dans le sérotype O1, on retrouve deux biotypes : le biotype El Tor et le biotype classique (voir **Tableau 2**). La présence de l'antigène O ou les facteurs de l'antigène ne sont pas directement impliqués à l'identification d'une souche comme étant cholérique ou non, car le sérotype O139 (pathogène cholérique) et les sérotypes O22 et O155 présentent les mêmes facteurs antigéniques. [2], [15]

-L'antigène K (antigène capsulaire) a été observé chez le sérotype O139. On parle souvent aussi d'un type antigénique (l'antigène M) chez les autres souches rappelons que *V. cholerae* est faiblement encapsulé. [2], [7], [14]

**Tableau 2** : quelques différences fondamentales entre les deux biotypes du sérotype O1  
[31]

TEST	BIOTYPE CLASSIQUE	BIOTYPE EL TOR
HEMOLYSE D'ERYTHROCYTE DE MOUTON	-	+
AGGLUTINATION D'ERYTHROCYTE DE POULET	-	+
REACTION DE VOGES-PROSKAUE	-	+
RESISTANCE A LA POLYMYXINE B	S	R
PHAGE IV	S	R
PHAGE 5	R	S

### I-3-5-Caractères Génomiques

*V. cholerae*, comme tous les procaryotes, présente son génome à l'intérieur du cytoplasme sans membrane nucléaire. Le génome est constitué par deux chromosomes circulaires, ce qui constitue une exception dans le monde bactérien [17].

Le chromosome 1 d'une taille d'environ 2,9 Mpb présente 42% des gènes (hypothétiques) utilisés pour la vie cellulaire dont ceux encodant la réplication et la réparation d'ADN, transcription, traduction, la biosynthèse de la paroi ainsi qu'une grande variété du métabolisme central. Le chromosome 1 contient également les gènes les plus connus pour la

pathogénicité (toxin co-regulated pilu, toxine cholérique, lipopolysaccharide et la machinerie de sécrétion protéique). Pour ce qui est du chromosome 2, sa taille est estimée à environ 1,07 Mpb mais possède 58% des gènes (hypothétiques) utilisés par la cellule. Le petit chromosome contient un intégron qui serait responsable de l'apparition des souches résistantes. La présence du chromosome 2 serait due à une conjugaison bactérienne lors de laquelle une souche ancestrale de *V. cholerae* l'aurait acquis sous forme de plasmide suite à des exigences environnementales. [16]

Comparativement au génome d'autres bactéries pathogènes à Gram négatif (comme *E. coli*), ils présentent des intégrons (système de capture de gènes) leur conférant une forte capacité de résistance aux antibiotiques.

L'îlot de pathogénicité CTX (cholera Toxin X  $\phi$ ) retrouvé chez les Sérogroupes O1 et O139 proviendrait d'un phage qui se retrouve sur le chromosome 1 sous forme de prophage. La présence de ce gène a aussi été observé sur le chromosome 2 chez le biotype El Tor. [2], [16]

On retrouve chez certaines souches des plasmides qui possèderaient des gènes dont la fonction est encore mal connue. [2]

#### **I-4-Classification de *Vibrio cholerae* (voir *Tableau 3*)**

La famille des Vibrionacea a subi d'énormes modifications depuis la première édition jusqu'à nos jours. Actuellement la famille des Vibrionacea présente trois (3) Genres : *Vibrio*, *Salinivibrio*, *Photobactérium*. Le genre *Aeromonas* a été replacé dans un nouvel ordre constituant l'ordre des *Aeromonales*.

**Tableau 3** : classification de *V. cholerae* dans le monde bactérien

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

Le genre *Vibrio* présente une grande similarité avec les genres *Plésiomonas* et *Aeromonas* qui sont toute oxydase positive. Il est crucial de connaître les différences fondamentales entre ces genres (voir **Tableau 4**). Par ailleurs le genre *Vibrio* a une certaine ressemblance avec le genre *Pseudomonas* mais un simple test de fermentation permet de les différencier car *Vibrio* est fermentatif ce qui n'est pas le cas pour *Pseudomonas*. [18]

Le Genre *Vibrio* comporte 44 espèces dont certaines interviennent grandement dans le domaine clinique. Par contre d'autres ne sont observées que dans les Interactions environnementales. Douze des quarante-quatre espèces sont connues dans le domaine clinique dont *Vibrio cholerae* qui a causé sept (7) pandémies du choléra. Douze espèces de *V. cholerae* sont décrits comme pathogènes (voir **Tableau 5**). [2]

**Tableau 4** : caractéristiques différentielles des Genres proches de vibrio.

Caractères différentiels : <i>Vibrio</i> – <i>Aeromonas</i> – <i>Plesiomonas</i>			
	<b>Vibrio</b>	<b>Aeromonas</b>	<b>Plesiomonas</b>
Ciliature	Pm	Pl	Pl
Oxydase	+*	+	+
Halophile	V	-	-
Sensibilité 0129	+*	-	V
Gélatinasse	+	+	-
Gaz en glucose	-	V	-
Arginine dihydrolase	-*	+*	+
Ornithine décarboxylase	v	-*	+

**Pm** : polaire monotriche ; **Pl** : polaire lophotriche ; **V** : variable ;\* : quelques exceptions

**TABLEAU 5:** Caractéristiques différentielles des Espèces de vibrio couramment retrouvées dans les échantillons cliniques

caractères	<i>V. cholerae</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnisii</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Production d'indole	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Réaction voges-proskauer	+	+	-	+	-	-	D	-	+	-	-	-
ADH	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	-
LDC	+	+	D	D	-	-	+	-	-	+	+	+
ODC	+	D	-	-	-	-	-	-	-	+	+	D
Production d'acide à partir du D-glucose	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+
Production de gaz à partir du D-glucose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Production d'acide à partir du L-arabinose	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Production d'acide à partir du D-arabitol	-	-	-	-	D	+	-	-	-	-	-	-
Production d'acide à partir du cellobiose	-	-	+	-	-	-	D	-	-	-	-	+
Production d'acide à partir du lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	+
Production d'acide à partir du maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Production d'acide à partir du D-mannitol	+	+	+	-	+	+	D	-	+	+	+	D
Production d'acide à partir de la salicine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Production d'acide à partir du saccharose	+	+	+	-	+	+	D	-	+	-	-	-
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Lipase	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
ONPG	+	-	+	-	-	-	-	-	D	+	-	+
Milieu à 0% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Milieu à 1% NaCl	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Milieu à 6% NaCl	D	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	D
Milieu à 8% NaCl	-	+	D	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Milieu à 10% NaCl	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milieu à 12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): positif, 65 à 100 % sont positifs au test ;(-): négatif, 40 à 0% sont négatifs au test ; D : variable, 65 à 40 % sont positifs au test

## I-5-Isolement et Identification

L'isolement et l'identification d'une souche de *V. cholerae* nécessite la mise en place d'une succession de méthode bactériologique (voir **Figure 7**).

### I-5-1-Isolement de *Vibrio cholerae*

La recherche et l'isolement de *V. cholerae* se fait habituellement à partir des eaux usées et des fèces des malades ou porteurs chroniques. Toutes fois l'échantillon le plus commun reste les fèces des personnes malades de diarrhée cholérique ou non cholérique. [18]

L'échantillonnage est effectué sur l'eau peptonée alcaline (EPA) ou l'eau peptonée alcaline hypersalée (EPSA) à pH 8,4 qui favorise le genre *Vibrio*. L'enrichissement constitue en une succession de culture sur le milieu EPA ou EPSA. Il a pour but d'une part de permettre la réparation des cellules endommagées et d'autre part de favoriser *Vibrio* par rapport aux autres bactéries. [18], [12]

Après ensemencement, ces milieux sont incubés à 37° C pendant une période de 6 à 8 heures avec d'éventuels repiquages sur le même milieu.

L'isolement est réalisé à partir du voile obtenu sur les milieux d'enrichissement.

L'isolement est réalisé à partir de l'enrichissement et plus rarement directement, sur divers milieux solides en boîte de Pétri :

- gélose nutritive ordinaire à pH 7,0 ; GN alcaline à pH 8,2 ou gélose hyperalcaline pH 8.5
- Milieu TCBS (ou gélose saccharosée, au thiosulfate ou milieu de Nakanishi et Kobayashi). Ce milieu permet la croissance rapide *V. cholerae* pendant une période de 15 à 24 heures à 37° C, sous forme de colonies jaune brun de 2 à 3 mm de diamètre (voir **Figure 5**). Les autres vibrions donnent des colonies jaunes ou translucides de grande taille ou des colonies incolores avec un centre vert comme *V. parahaemolyticus*. La plupart des autres micro-organismes sont inhibés (au moins pendant 24 heures); cependant, certains *Pseudomonas*, *Proteus* et *Streptocoques fécaux* peuvent se développer en donnant de minuscules colonies incolores.



*Figure 5* : aspect des colonies de *Vibrio cholerae* sur le milieu TCBS

#### **I-5-2 Identification de *vibrio cholerae***

L'identification des vibrio repose sur l'étude des caractères biochimiques et surtout sérologiques (voir *Figure 6*). Les caractères d'appartenance au genre sont : bacille incurvé Gram -, oxydase +, catalase +, très mobile, aéro-anaérobie, nitrate réductase +, fermentation du glucose +.

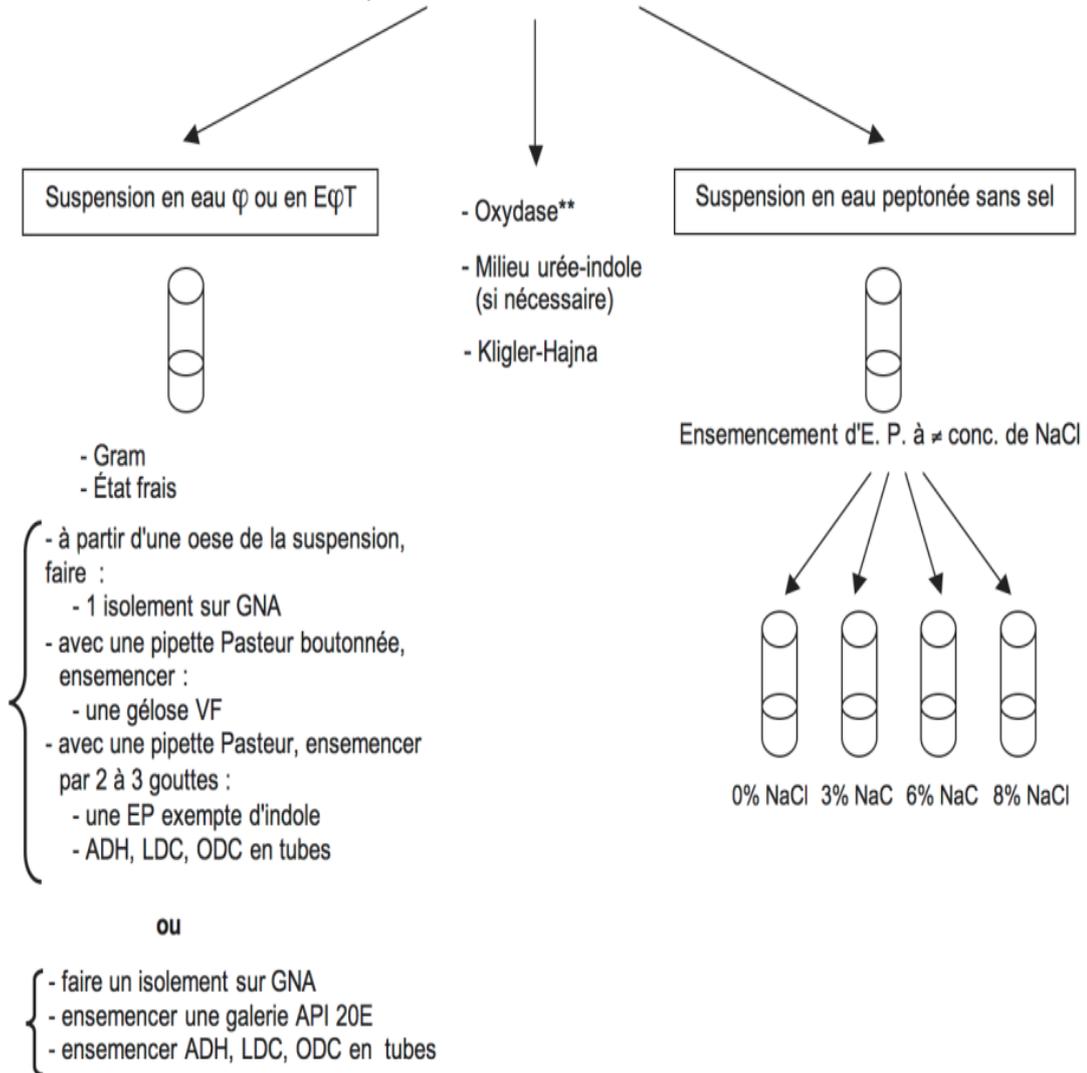
L'identification se fait à partir d'une colonie suspectée selon le milieu utilisé. Avant d'entamer une galerie, il est recommandé d'effectuer certains tests présomptif.

Un test Oxydase permet de se diriger vers l'espèce *Vibrio cholerae* car dans le genre seul deux espèces sont oxydase négatif.

Constituer la galerie d'identification d'une souche de *Vibrio cholerae* :

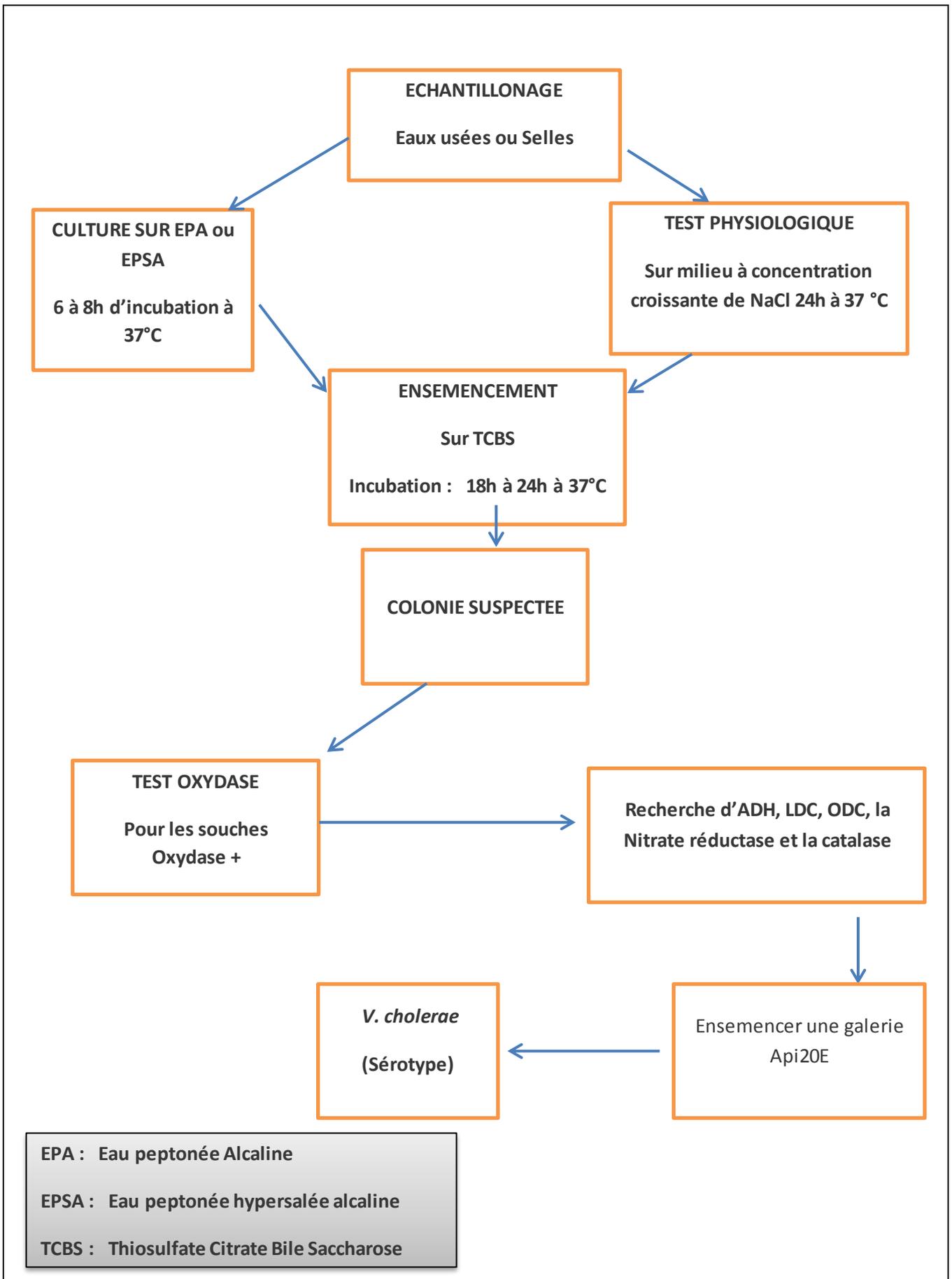
- 1 gélose Viande-Foie
- 1 GNA
- 1 Kligler-Hajna\*
- 1 disque ONPG
- 1 test indole (E. P. exempte d'indole ou milieu urée-indole)
- ADH, LDC, ODC en tubes
- ou
- une plaque API 20E
- ADH, LDC, ODC en tubes

A partir d'une culture sur GNA en tube



Incuber la nuit (18-24 h) à 37°C.

**Figure 6 :** identification biochimique de *Vibrio cholerae*



**Figure 7:**Recapitulatif de la méthode d'isolement et d'identification

## I-6-Pouvoir pathogène et Virulence

### I-6-1-Pouvoir Pathogène

Le Pouvoir pathogène se définit comme étant la capacité d'un organisme de déclencher une pathologie (dysfonctionnement d'un organisme) donnée.

Il a été découvert dès 1970 que les infections dues à *Vibrio cholerae* ne sont pas l'apanage des sérovars O : 1 et que les sérovars non O : 1 peuvent être responsables d'infections intra- ou extra-intestinales. Certaines souches sont responsables de simples diarrhées aiguës d'autres sont responsables de pathologie plus sévère (le choléra). Il y a que deux souches (Sérogroupe O 1 et Sérogroupe O139) qui sont responsables du choléra. [2]

Les agents responsables du choléra sont appelés les vibrions cholériques.

#### **\*Le cas du choléra**

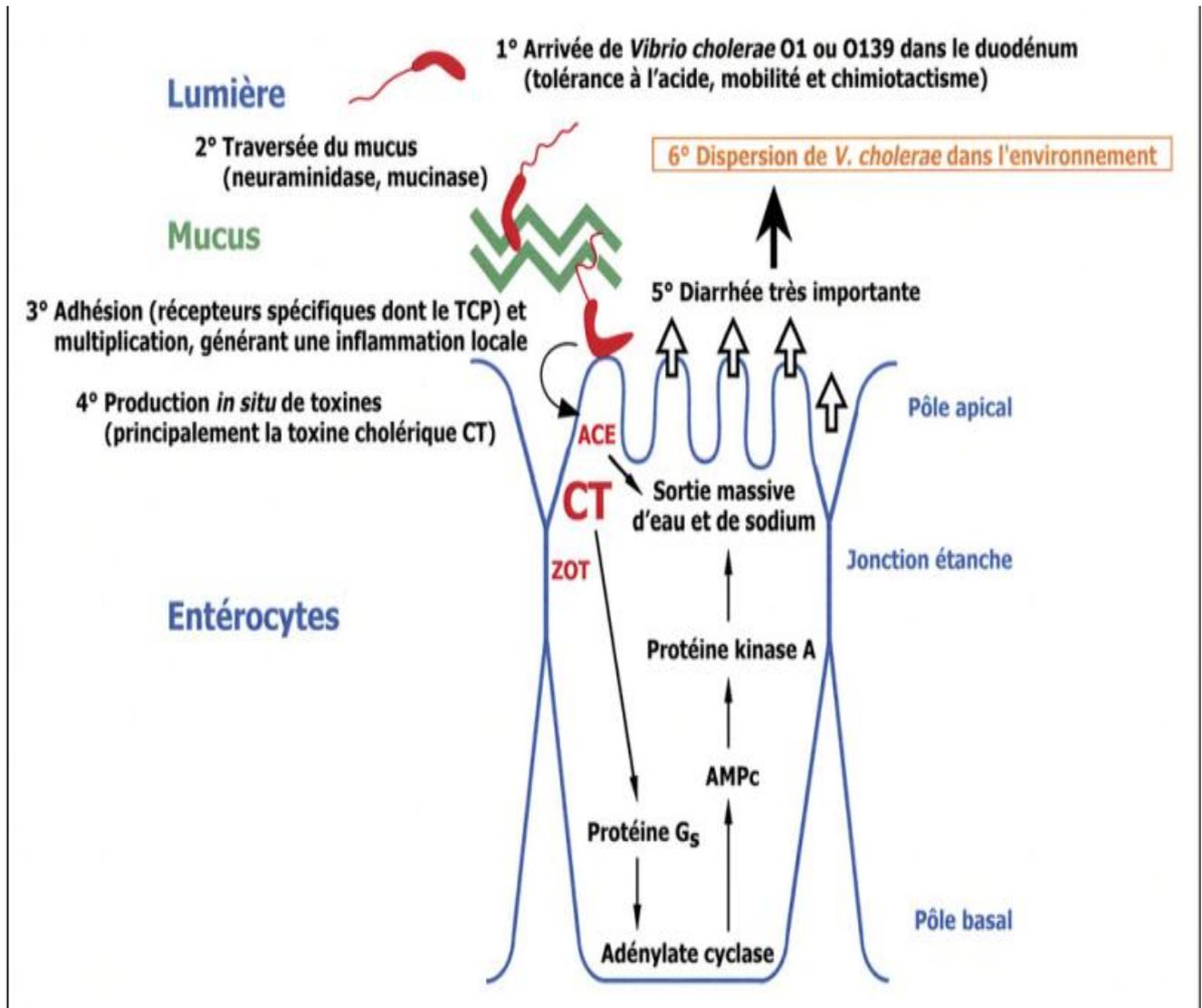
Les vibrions cholériques, responsable du choléra, population constituée de souches appartenant à 2 sérogroupes – O1 et O139 – de l'espèce *V. cholerae*. Ces souches se sont adaptées à l'homme.

Le pouvoir pathogène de la bactérie s'explique par la libération de la toxine cholérique analogue à celle de la toxine LT d'*E. coli* et des pili de la bactérie.

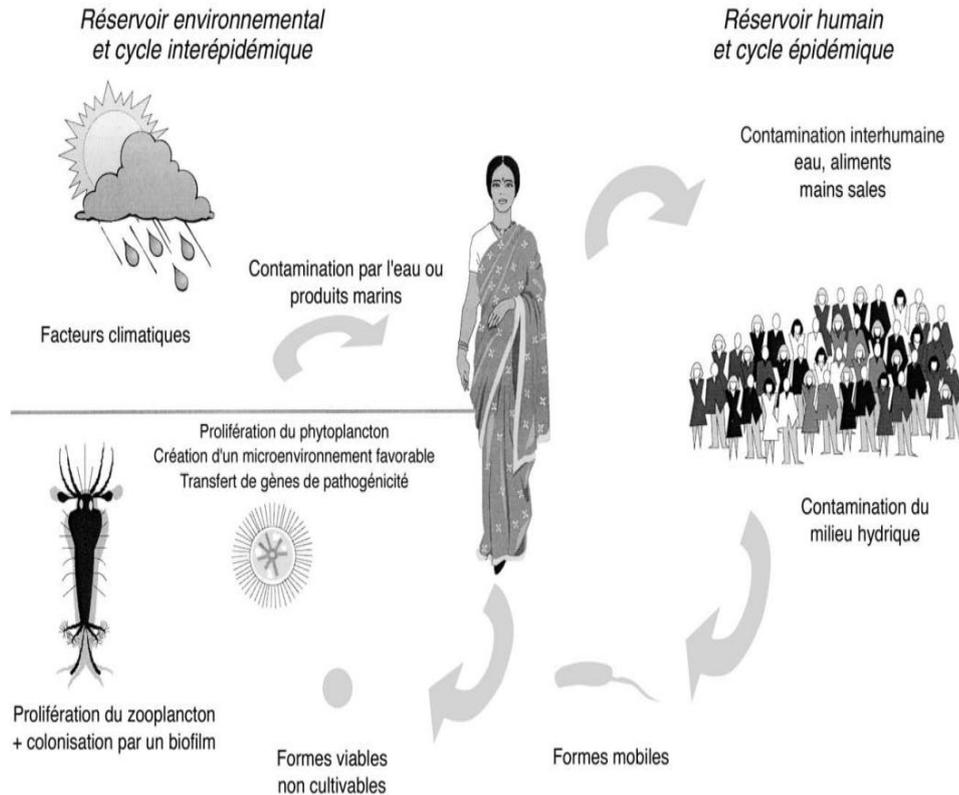
La bactérie contamine les personnes saines par le biais des aliments contaminés (les poissons, les fruits de la mer, les fruits et légumes). Le choléra peut aussi résulter d'une contamination de personne à personne (voir **Figure 9**). La dose infectieuse déterminée expérimentalement est de l'ordre de  $10^8$  à  $10^{11}$  bactéries. Elle est très sensible à l'acidité stomacale. Il a été démontré que lorsqu'on neutralise l'acidité stomacale par du bicarbonate de soude, la dose infectante est de l'ordre de  $10^4$  à  $10^6$  bactéries seulement. Les germes qui y échappent, arrivent au niveau du l'intestin grêle et se fixent à la partie proximale. Ils colonisent ainsi l'intestin grêle grâce à différents facteurs de pathogénicité comme la TCP (Toxin coregulated pilu), les différents hémagglutinine, les facteurs accessoires de colonisation. La toxine cholérique est produite lorsque la bactérie adhère à l'épithélium intestinal par des pili (voir **Figure 8**). La conséquence est le passage de l'eau et des électrolytes, des cellules vers la lumière intestinale, pouvant atteindre jusqu'à 15 litres par jour qui entraîne une déshydratation sévère et mortelle. Les selles ne sont jamais sanglantes sauf en cas d'association avec une autre pathologie comme une shigellose ce qui sous entendra que les agents responsables ne sont pas invasifs. Le choléra se manifeste ainsi par

de fortes diarrhées, des vomissements, des crampes, des yeux enfoncés dans les orbites donnant l'aspect au visage une allure cyanosée. On ne remarque toutes fois pas d'élévation de température.

A côté de ces formes cliniques typiques, il existe de rares cas <<sec>> entraînant la mort par collapsus sans aucune manifestation de diarrhée. [2], [12], [19], [20]



**Figure 8 :** étapes de la pathogénèse de *Vibrio cholerae* (cas du choléra) [43]



**Figure 9 :** cycle de la transmission du choléra dans l'environnement [44]

### \*Autres pathologies non cholérique

D'autres souches de l'espèce *V. cholerae* appelées Non-O1 et Non-O139, interviennent dans certaines pathologies humaines. Des souches Non-O1, Non-O139 ont été isolées dans des cas de diarrhées, de septicémie (présence du pathogène dans le sang), des infections auriculaires et aussi dans certaines plaies. Les personnes saines sont contaminées par l'eau et les aliments contaminés. [22]

Les facteurs de pathogénicité pour les souches Non-O1, Non-O139 sont actuellement mal définis mais il s'est avéré que ces souches ne possèdent pas le gène de la toxine cholérique ainsi que l'îlot de pathogénicité **CTX $\Phi$** . Les souches Non-O1, Non-O139 ont une forte activité protéolytique, cytotoxique, entérotoxique non cholérique. L'activité entérotoxique intervient dans le cas des diarrhées non cholérique qui se caractérisent contrairement au choléra par une forte invasion et une lésion de l'épithélium intestinal. La diarrhée serait due à une forte sécrétion de facteur de colonisation qui induit une forte accumulation de fluide par un mécanisme actuellement mal connu. Ainsi les personnes atteintes de ce type de diarrhée ont des crampes ainsi qu'occasionnellement de la fièvre. Quant à la cytotoxicité et

la protéolyse, elles interviennent principalement dans le cas de septicémie et les infections auriculaires. [2], [22], [23], [24].

Ainsi les souches les plus retrouvées sont : *V. cholerae* O-10 ; O-19 ; O-15 ; O-152 ; O-26. [22]

### **I-6-2-Virulence de *V. cholerae***

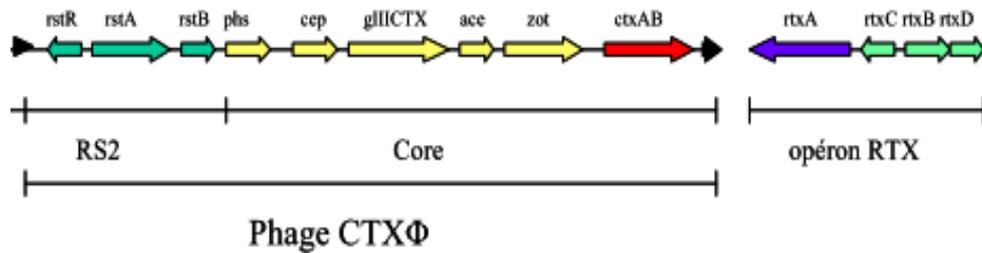
La virulence est un facteur quantitatif du pouvoir pathogène. Il existe du degré de virulence très variable au sein des différents sérogroupes de *V. cholerae*, ainsi que l'aptitude de certains sérogroupes à engendrer une véritable épidémie, et va dépendre de la présence d'un certains nombres de facteurs de virulence. Parmi ces facteurs, on distingue les facteurs de virulences dits <<majeurs>> des facteurs de virulence dits <<accessoires>>. [35]

#### **A- Facteurs de virulence<<majeurs>> chez *V. cholerae***

Les facteurs de virulences dits <<majeurs>>, retrouvés spécifiquement dans les sérogroupes O1 et O139 qui apparaissent être principalement causatifs du caractère hautement pathogène de ces sérogroupes capables de provoquer une épidémie. Un îlot de pathogénicité **CTX** (voir **Figure 10**), de 7 à 9,7Kpb qui contient six gènes, a été reconnu comme étant responsable de la virulence chez les souches O : 1 et O : 139 : le gène **ctxAB** (ctxA et ctxB, toxine cholérique), le gène **zot** (toxine Zonula), le gène **cep** (Core encoded pili), le gène **ace** (accessory cholera enterotoxin), le gène **orfU** (de fonction inconnue). Il s'agirait du génome d'un bactériophage filamenteux qui se trouve sous forme de prophage. [29]

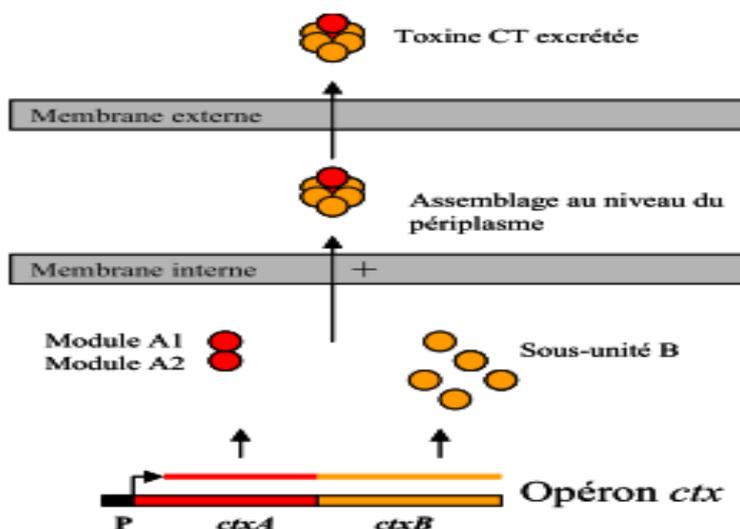
##### **a) La toxine cholérique CT (Cholera Toxin) de *V. cholerae***

La toxine cholérique CT est une exotoxine, une protéine excrétée dans le milieu extérieur. La toxine CT codée par le gène **ctxAB** localisé sur l'îlot CTX. Les gènes ctxA et ctxB codent les deux modules A (deux domaines A1 et A2) et B de la toxine CT. [36]



**Figure 10 :** structure du phage CTX et de l'opéron RTX chez *V. cholerae*. Les flèches désignent le sens de la transcription

La sous-unité B de la toxine CT se fixe à un récepteur spécifique, le GM1 ganglioside, la surface des entérocytes (voir **Figure 11**). La **Neuraminidase** sécrétée par *V. cholerae* intervient aussi pour cette liaison en dégradant les autres gangliosides en ganglioside 1 (GM1). La sous-unité A2 est reliée à la sous-unité B de façon non covalente ; la sous-unité A1 est impliquée dans l'activité enzymatique toxique : elle catalyse l'ADP-ribosylation de la protéine G $\alpha$  qui active l'adénylate cyclase de façon permanente non contrôlée, ce qui a pour effet une augmentation de l'AMPc intracellulaire induisant une perte de contrôle du flux ionique. A l'issue de cette cascade réactionnelle, se produit une perte d'eau par les cellules (principal symptôme du choléra), menant une diminution du volume intravasculaire, à une hypotension, à une hypoperfusion des organes et dans les cas les plus sévères à la mort du patient infecté. [35], [2]



**Figure 11 :** la toxine cholérique CT, expression, assemblage et excrétion. Les deux sous-unités A et B de CT sont codées par les gènes ctxA et ctxB localisés dans un même opéron

sous contrôle d'un même promoteur (P). Les sous-unités A et B sont excrétés et assemblées dans le périplasme puis excrétés dans le milieu extracellulaire

#### B) Le Toxin-Coregulated Pilus (CTP) chez *V. cholerae*

Le TCP est un facteur de virulence clé dans le processus infectieux de *V. cholerae* à deux titres : il s'agit d'un pilu de type IV, indispensable à la colonisation du tractus intestinal de l'homme; par ailleurs, le TCP sert de récepteur au bactériophage filamenteux CTXΦ, codant pour la toxine cholérique. La biosynthèse de ce pilu requiert l'activité de quinze gènes regroupés dans l'opéron TCP, localisé sur le chromosome I. cet opéron fait partie intégrante d'un îlot de pathogénicité VPI (39,5 kpb) caractéristique des souches de *V. cholerae* à l'origine d'épidémies et de pandémies. D'autres éléments sont présent dans le VPI dont un gène *toxT*, qui participe au système de régulation des gènes de virulence chez *V. cholerae* et un opéron (*acfABCD*) codant le facteur accessoire de la colonisation, ACF. [37], [38]

#### ***B-Facteurs de virulence<< accessoires>> chez V. cholerae***

Différentes facteurs secondaires ont été décrits chez *V. cholerae*, à la fois dans les sérogroupes O1 et O139, mais également dans les sérogroupes non-O1 et non-O139, responsables d'infections intestinales plus ou moins sévères et du caractère plus ou moins virulent des souches considérées.

##### a)-Autres Pilus

Le Pilus mannose-sensitive hémagglutinine (MSHA) semble également jouer un rôle dans la pathogénèse de *V. cholerae* O1 El Tor. Par ailleurs, le Pilus MSHA peut participer à une voie d'entrée TCP-indépendante du phage CTXΦ. [39].

##### B)-Les toxines de la famille RTX chez *V. cholerae*

La plupart des *V. cholerae* O1 El Tor et O139 portent des gènes codant une autre toxine qui appartient à la famille des RTX (repeats in toxin) hémolysine et leukotoxine. L'opéron *rtx* code pour la toxine RTX (*rtxA*), pour un activateurs (*rtxC*) et un transporteur (*rtxB* et *D*) La production de RTX est associée chez *V. cholerae* O1 El Tor et O139, à un effet cytopathogène lié à un arrondissement des cellules épithéliales humaines par dépolymérisation des filaments d'actine du cytosquelette. Il a été proposé que l'acquisition de l'opéron *rtx* dans ces deux sérogroupes O1 et O 139, participerait à leur émergence. [40], [19], [2]

### C)-Toxine cytolysine/hémolysine

*V. cholerae* biotype El Tor, ainsi que la plupart des souches non-O1, produisent une toxine cytolytique sécrétée dans le milieu extérieur : la toxine El Tor cytolysine/hémolysine. [41] Cette toxine présente une activité entérotoxique et apparaît contribuer à la pathogénèse de gastroentérites causées par les souches de *V. cholerae* ne synthétisant pas la toxine cholérique. Cette entérite est codée par le gène hlyA, sous forme d'un précurseur prepro-hlyA (de 79 KDa) maturé-hlyA (de 65 KDa), prepro-HlyA (de 79 KDa) maturé-HlyA (de 65 KDa), la cytotoxine active.

### d)-Les endotoxines ou LPS et la capsule chez *V. cholerae*

Contrairement aux exotoxines, les endotoxines regroupent les composés toxiques structuraux de la paroi des bactéries Gram-négatives, appelés lipopolysaccharide (LPS), dont leur toxicité ne survient qu'après avoir été libéré par la lyse cellulaire de la bactérie. Les LPS servent notamment de barrière pour protéger les bactéries des stress extérieurs et leur libération peut être provoquée par la réponse immunitaire de l'hôte ou par un traitement antibiotique. [32]

### e)-Le biofilm bactérien chez *V. cholerae*

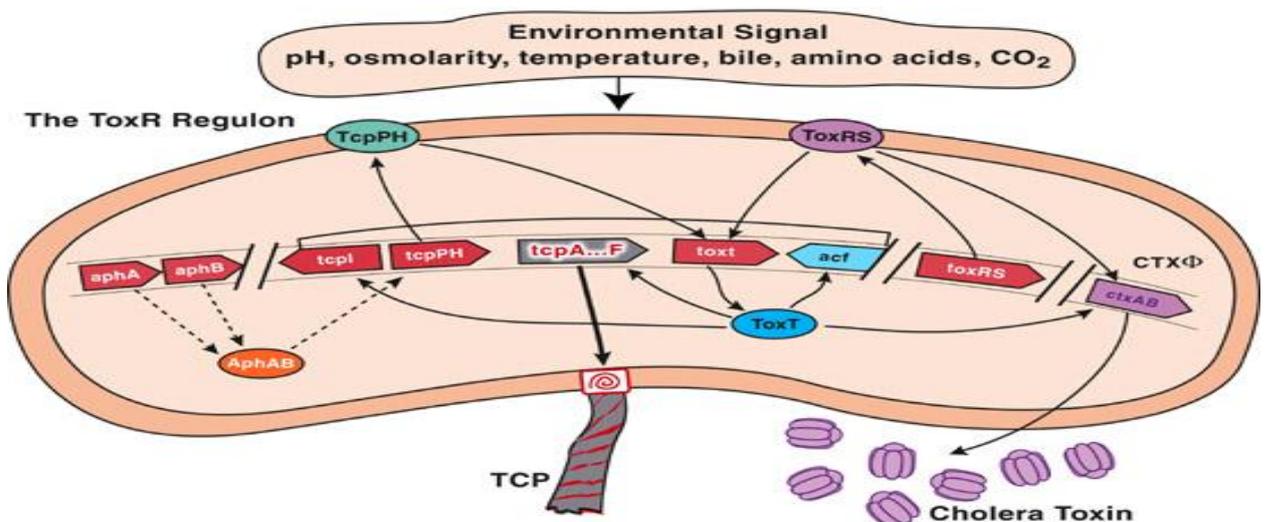
Le biofilm est une population ou une communauté de bactéries adhérant à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS). D'ailleurs la 1ere étape de la formation du biofilm passe par la synthèse d'EPS qui apportera plasticité au biofilm, résistance aux agents antimicrobiens, à la phagocytose, aux espèces oxygénées réactives et à des conditions nutritives limitantes. Chez *V. cholerae*, il a été montré que le flagelle agissait comme un capteur mécanosenseur contrôlant la synthèse d'EPS a montré qu'un mutant non flagellé produisait des EPS de façon non contrôlée et présentait *in vivo* une capacité de colonisation réduite, mais également une diminution significative de la toxine CT et de TCP *in vitro*. Il semblerait donc que la régulation du biofilm chez *V. cholerae* participe activement à la pathogénèse. [33]

### f)-Régulation de la Virulence

Le mécanisme de la virulence ainsi que sa régulation ont été longuement étudiés chez *V. cholerae*. Il paraît clair que la survie de la bactérie à l'intérieur de l'intestin grêle dépend de la régulation de sa virulence. L'îlot VP1 serait l'élément responsable de la régulation de

cette virulence. Cet îlot contient un régulon (ensemble de gène sous le contrôle d'un seul régulateur) de la virulence (ToxR) et un groupe de gène qui intervient dans la colonisation. **ToxR**, **TcpP** et **ToxT** sont des activateurs de transcription situés à l'intérieur de la membrane interne. **ToxR** (voir *Figure 12*) dans certaines conditions d'osmolarité (osmolarité faible) active les gènes des pompes ioniques (ompU et ompT) ainsi que celui du facteur **ToxT**. Ce dernier peut quant à lui être activé par une température moyenne ainsi qu'une faible concentration de sel biliaire. Le facteur **ToxR** activerait la synthèse de la toxine cholérique ainsi que les nombreux facteurs de colonisation comme le gène **tcp** qui gouverne la synthèse des pili de colonisation. Parallèlement la synthèse des facteurs de colonisation dépendrait fortement du mucus intestinal. [2], [25], [26]

Donc la virulence chez *Vibrio cholerae* serait sous le contrôle de nombreux facteurs génétique comme le régulon **ToxR** qui module la virulence en fonction du stress environnemental. Ainsi l'osmolarité de la lumière intestinale jouerait un rôle prédominant. [13]



*Figure 12* : régulation de la virulence chez *Vibrio cholerae* au niveau de la synthèse de la toxine cholérique

## **II-Bases Moléculaires de l'antibiorésistance chez *Vibrio cholerae***

### **II-1- Antibiotique**

#### **II-1- 1-Définition**

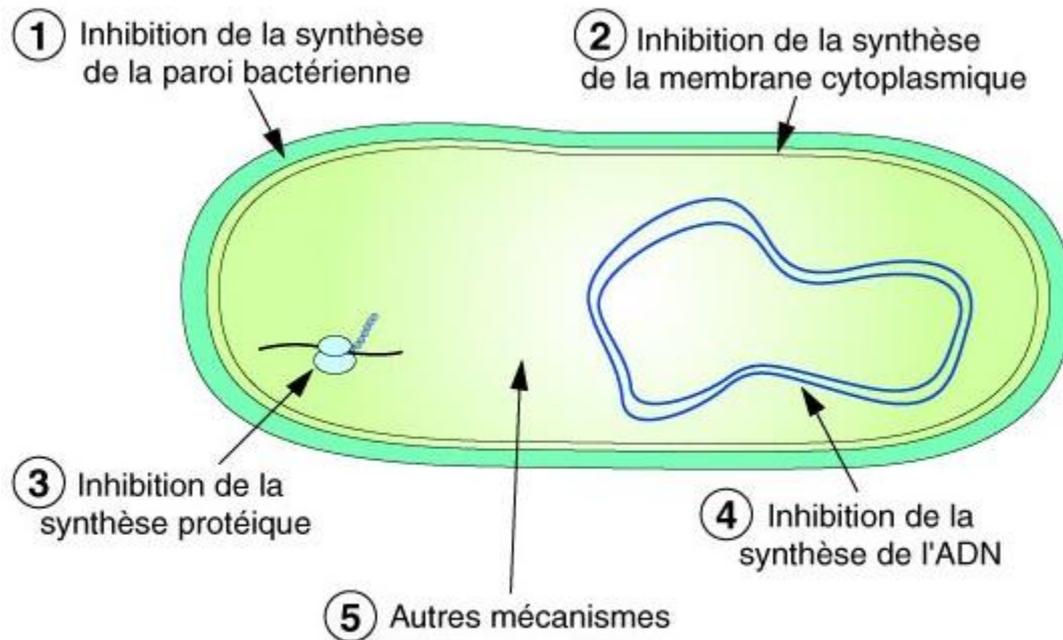
Les antibiotiques sont des molécules à activité antibacérienne. Ils sont soit d'origine biologique (provenant du métabolisme d'un microorganisme) soit semi-synthétique ou synthétique. [27]

Ils peuvent être inhibiteur de la croissance bactérienne (dans ce cas ils sont appelés molécules bactériostatiques) ou responsable de la létalité bactérienne (Bactéricide).

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte.

#### **II-1- 2-Mode d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes précises (voir **Figure 13**). Certains altèrent la structure des bactéries en inhibant la formation de leur paroi (cas des  $\beta$ -lactamases, des glycopeptides, et de la fosfomycines, qui bloquent différentes étapes de la voie de synthèse du peptidoglycane). D'autres comme les aminoglycosides, les tétracyclines, les phénicolés, les macrolides, les lincosamides et les treptogramines, qui se fixent sur le ribosome bactérien (sous unités 50S et/ou 30S), inhibant différentes étapes de la synthèse protéique. La synthèse des acides nucléiques (ADN ou ARN) peut aussi être perturbée par les antibiotiques (cas des sulfamides, du triméthoprines, des Quinolones, des rifamycines et des nitro-imidazoles). Par contre d'autres antibiotiques agissent sur la membrane plasmique en perturbant le transport des nutriments (C'est le cas des polymixines). Tout antibiotique a un spectre d'action au-delà lequel, la bactérie est dite sensible et en deçà, la bactérie est dite résistante. [27], [28]



*Figure 13* : mode d'action des antibiotiques

## II-2-Mécanismes de résistance

Les bactéries peuvent ainsi être sensibles ou résistantes aux antibiotiques en fonction de leur caractéristique génétique. Différents mécanismes ont ainsi été décrits, la résistance peut aller d'une modification de la perméabilité membranaire à une modification de l'affinité moléculaire.

On doit distinguer la résistance dite "**innée ou naturelle**" (cas par exemple des streptocoques qui, en raison de l'absence d'une chaîne de transporteurs d'électrons, ne peuvent assurer le transport actif des aminoglycosides à travers la membrane plasmique et, de ce fait, résistent à ces antibiotiques), de la résistance dite "**acquise**" apparaissant chez les bactéries jusqu'alors sensibles aux antibiotiques. [27], [28]

### II-2-1-Mécanisme de résistance innée ou Naturelle

La résistance naturelle est une forme de résistance à un antibiotique donné qui concerne toutes les bactéries de la même espèce (Exemple : Le genre *Proteus* est naturellement résistant à la colistine). La résistance naturelle est donc un caractère phylogéniquement stable. Les bactéries Gram négatif, dont la proportion en peptidoglycane est faible, sont naturellement résistants aux antibiotiques de types "**glycopeptides**".

## **II-2-2-Mécanisme de résistance Acquis**

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné lorsqu'elle est capable de se développer en présence. Le support de telle résistance est génétique soit chromosomique soit par acquisition de gène. [27]

### **\*Mécanisme de résistance par mutation**

C'est une modification brusque de l'ADN transmissible héréditairement. La mutation est naturellement rare et brusque mais elle peut être provoquée par un facteur mutagène comme les rayons ultra-violet (U.V). Sur l'ensemble des mécanismes de résistance à un antibiotique, la mutation représente 10 % seulement. [27]

### **\*Mécanisme de résistance par acquisition de plasmide**

Un plasmide est un ADN double brin extra-chromosomique, de taille variable généralement circulaire, capable de s'auto-répliquer (réplicon) et de se transférer d'une bactérie à une autre. Un plasmide peut contribuer à la résistance à un antibiotique ou à la résistance à plusieurs antibiotiques. Les plasmides peuvent être transférés d'une souche à une autre par le mécanisme de la conjugaison. [27]

### **\*Mécanisme de résistance par Transposon**

Un Transposon est un gène mobile, appelé gène << sautant >>, codant pour une résistance aux antibiotiques et qui possède des séquences d'insertion ce qui lui confère la capacité de se transférer d'un plasmide vers un chromosome, d'un chromosome vers un autre chromosome, ou d'un plasmide vers un plasmide. Ainsi un élément génétique n'ayant pas de promoteur peut se déplacer et se trouver vers une position génétique ayant un promoteur. [27]

### **\*Mécanisme de résistance par Intégrons**

Les intégrons sont des systèmes d'éléments génétiques capables de capter ou de perdre un gène. Un intégron possède donc, principalement, un site d'attachement et un ou plusieurs promoteurs. Les gènes captés sont sous forme circulaire appelé cassette. Elles sont intégrées par un mécanisme de recombinaison spécifique grâce à une intégrase. Une cassette peut ainsi renfermer un gène de résistance à un antibiotique. Lorsqu'elle est captée par un

intégron, grâce au promoteur de l'intégrons, elle s'exprimera apportant ainsi la résistance à la bactérie. [27]

### **II-3-Antibiorésistance chez *Vibrio cholerae***

Dans les traitements contre les infections à base de *V. cholerae* deux familles d'antibiotiques sont principalement utilisées. Il s'agit des Tétracyclines, du Cotrimoxazole, des Macrolides et des Quinolones. Dans le cas du choléra, le traitement par antibiotique a pour but de diminuer le foyer d'infection car le traitement le plus urgent demeure la réhydratation. Toutes fois, le traitement par antibiotique permettrait de diminuer le volume de liquide libéré. [31] [48]

La résistance aux antibiotiques chez *V. cholerae* est de plus en plus observable. Ceci serait dû à de nombreux mécanismes de transfert génétique. Toutes fois la résistance à un antibiotique donné est relié à un mécanisme (et ou transfert) génétique donné. [45]

#### **II-3-1-INTEGRON**

Les intégrons sont des éléments génétiques de capture et d'expression des gènes, capturés sous forme de cassette. Dans la structure générale d'un intégron, on retrouve un gène codant pour l'intégrase, un site d'attachement (*att*) et un (ou plusieurs) promoteur. Sur la base de la séquence du gène *int* (codant pour l'intégrase), les intégrons sont actuellement divisés en cinq (5) groupes. Les bactéries pathogènes présentent généralement les intégrons de classe 1. [45]

Des souches de *V. cholerae* isolées au Brasil et au Vietnam présentèrent un intégron de classe 1. Cet intégron appelé *qnr* a été observé comme siège de la résistance à un fluoroquinolone (Ciprofloxacine). Un autre intégron a été décrit *aadA1* intervenant dans la résistance à la Streptomycine. [45], [31]

#### **II-3-2-ELEMENTS CONJUGATIFS INTEGRATIF**

Il s'agit d'élément génétique mobile et transférable par conjugaison. Ces éléments ont ainsi d'être mobile à l'intérieur d'un organisme et aussi d'apporter leur caractéristique à une autre bactérie par le mécanisme de conjugaison.

Chez *V. cholerae*, un élément génétique particulier appelé élément **SXT** été décrit. Il s'agit d'une molécule d'ADN capable de s'intégrer au chromosome bactérien et aussi de se déplacer à travers celui-ci. L'élément **SXT** a la particularité d'auto-circulariser lorsqu'il n'est pas intégré au chromosome et d'être transféré par conjugaison. Contrairement aux

plasmides, il ne peut pas s'auto-répliquer ni s'auto-exprimer. Son excision, intégration et conjugaison sont régulés par un système **SOS**. La dissémination de cet élément serait largement influencé par la ciprofloxacine qui agirait comme inducteur de la conjugaison intra-spécifique.

L'élément **SXT** a été mentionné dans la résistance à plusieurs antibiotiques dont le **Sulfaméthoxazol-triméthoprime**, la **Streptomycine**, le **Chloramphénicol**, la **tétracycline** et l'**érythromycine**. [31], [45]

### II-3-3-Les PLASMIDES

Chez *V. cholerae*, un plasmide apporté par *E. coli K12* apporterait la résistance à la tétracycline, à l'ampicilline, à la kanamycine, à la streptomycine, à la gentamicine ainsi qu'au triméthoprines. Des souches de *V. cholerae O : 139* isolées en Inde présentent une résistance à la tétracycline, à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la gentamicine, à la kanamycine, au sulfaméthoxazole et au triméthoprime. Ces résistances seraient dues à un plasmide de 200 Kpb qui peut diriger sa propre transmission. [31], [45].

### II-3-4-LES BETA-LACTAMASES A SPECTRE LARGE

Les bêta-lactamases sont une famille d'enzyme capable d'hydrolyser un cycle à quatre carbones présents chez les antibiotiques de la famille des bêta-lactames.

La grande majorité des souches de *V. cholerae* résistant pour l'ampicilline possèderait des gènes de la bêta-lactamase. Celui-ci leur confère une grande résistance pour les antibiotiques de la famille des bêta-lactames. [45]

## III-EPIDEMIOLOGIE DU CHOLERA

Sous sa forme moderne, l'épidémiologie se définit comme étant une discipline qui se sert des méthodes quantitatives pour étudier les maladies dans les populations humaines et éclairer les mesures de prévention et de lutte. Les premières études sur l'épidémiologie et la naissance du concept proviennent d'une étude sur le choléra à Londres par Docteur John Snow. [46]

Lorsque la propagation d'une maladie infectieuse dans une population humaine s'effectue à l'échelle mondiale, on parle de pandémie. Le choléra est une maladie fortement pandémique, la souche de biotype classique a été longuement la souche responsable de cas

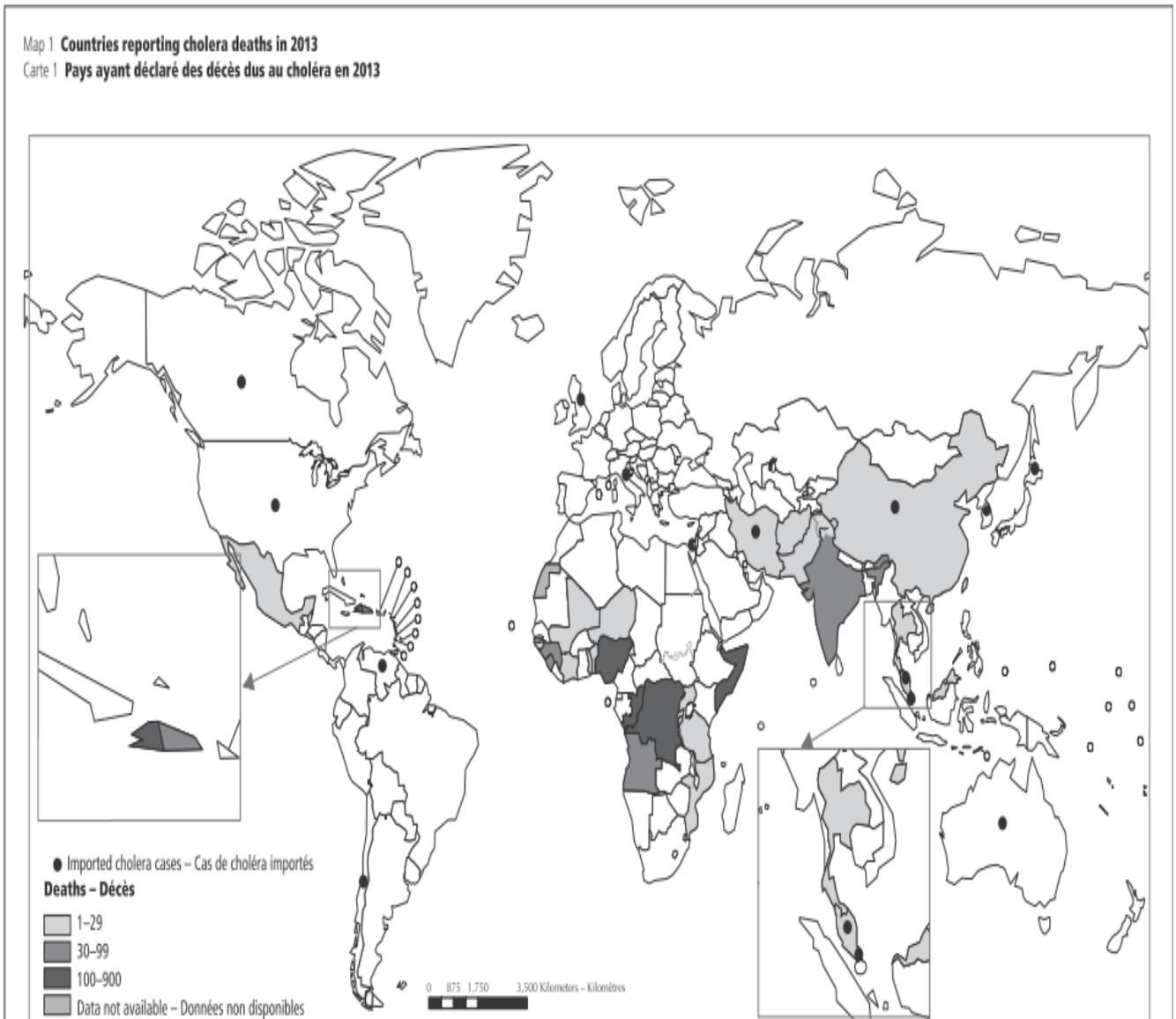
de pandémie. Cette souche est celle décrite depuis l'apparition de la pandémie en 1817 jusqu'à 1961. Cette période a été caractérisée par six pandémies. [49], [20]

L'apparition en 1961 d'un nouveau biotype, biotype <<El Tor>>, sur l'île **Sulawesi** en **Indonésie** a marqué le début de la septième pandémie. Nous sommes actuellement dans la septième pandémie qui continue de causer des épidémies saisonnières dans la plupart des pays en développement, et dans la huitième pandémie, suite à l'apparition d'un nouveau sérotype pathogène <<souche O : 139>> rapportée en **Inde** et au sud du **Bangladesh**. [20]

En 2013, 47 pays ont notifié un total cumulé de 129 064 cas de choléra, dont 2102 décès, soit un taux de létalité (TL) de 1,63%. Cela représente une diminution de 47% du nombre de cas notifiés par rapport à 2012 et c'est la deuxième année consécutive que le nombre de cas de choléra notifiés est en baisse. En 2013, 47 pays ont notifié des cas, contre 48 en 2012. [47]

Le choléra représente une charge estimative de 1,4 à 4,3 millions de cas, et de 28 000 à 142 000 décès par an. Toutefois, au cours des flambées, de nombreux pays notifient comme cas de choléra de nombreux cas de diarrhée aqueuse aiguë qui ne sont pas dus à *Vibrio cholerae*. Les nombres réels de cas de choléra diffèrent donc des nombres notifiés. Des cas ont été signalés dans toutes les régions du monde (*Figure 14*), dont 22 pays en Afrique, 14 pays en Asie, 2 en Europe, 8 dans les Amériques et 1 en Océanie. Sur les 26 pays qui ont notifié des décès par choléra, 17 étaient situés sur le continent africain, représentant 1366 décès (TL, 2,43%), ou 65% du total mondial, tandis que, dans les Amériques, la République dominicaine et Haïti ont notifié 635 décès (TL, 1,04%) ou 30% du total mondial (*Tableau 6*). Des TL <1% ont été signalés par 4 pays et 17 autres ont signalé des TL allant de 1% à 5%. Des TL >5% ont été signalés dans 5 pays d'Afrique: la Guinée, le Mali, la République du Congo (par la suite dans le texte, Congo), la République Unie de Tanzanie (RUT) et la Sierra-Leone (*Tableau 6*). Des cas importés ont été signalés dans les Amériques, en Asie, en Europe et en Océanie (*Figure 14*, *Tableau 6*). En 2013, 47,3% des cas notifiés (60 763) avaient pour origine une flambée en cours en Haïti et en République dominicaine, ayant débuté en octobre 2010. Un total de 56 329 cas a été signalé en Afrique, soit une baisse de 52% par rapport à 2012 (117 570 cas). En 2013, les cas notifiés en Afrique ont représenté 43,6% du total, soit une faible proportion par rapport au pourcentage de 93% à 98% du total des cas signalés pendant la période 2001-2009. Cette moindre proportion de cas en Afrique est observée depuis 2010 et est liée à une baisse importante du nombre de cas sur ce

continent depuis 2011 ainsi qu'à la flambée qui se poursuit sur l'île d'Hispaniola. Le continent asiatique a signalé une augmentation de 57% par rapport à 2012 (7367) avec 11 603 cas notifiés, représentant 9% du total. [47]



**Figure 14:** répartition géographique du choléra dans le monde selon l'OMS

Tableau 6 : répartition mondiale des cas de choléra

Region – Région	Country – Pays	Total no. of cases (including imported cases/deaths) – Nombre total de cas (incluant cas importés et décès)	No. of imported cases – Nombre de cas importés	No. of deaths – Nombre de décès	CFR % – TL (%)
Africa – Afrique	Angola	6655		86	1.29
	Benin – Bénin	528		6	1.14
	Burundi	1557		17	1.09
	Democratic Republic of the Congo – République Démocratique du Congo	26944		491	1.82
	Congo	1624		221	13.61
	Côte d'Ivoire	56		2	3.57
	Cameroon – Cameroun	29			
	Ghana	50			
	Guinea – Guinée	319		32	10.03
	Guinea-Bissau – Guinée-Bissau	969		28	2.89
	Liberia – Libéria	92			
	Mali	23		2	8.70
	Mozambique	1869		19	1.02
	Namibia – Namibie	3			
	Niger	585		13	2.22
	Nigeria – Nigéria	6600		229	3.47
	Sierra Leone	377		32	8.49
	Somalia – Somalie	6864		140	2.04
	Togo	166		4	2.41
	United Republic of Tanzania – République-Unie de Tanzanie	270		17	6.30
Uganda – Ouganda	748		27	3.61	
South Africa – Afrique du Sud	1				
<b>Total</b>		<b>56 329</b>		<b>1 366</b>	<b>2.43</b>
Asia – Asie	Afghanistan	3957		14	0.35
	China – Chine	53	2	1	1.89
	India – Inde	6008		54	0.90
	Iraq	1			
	Iran (Islamic Republic of) – Iran (République islamique d')	256	211	7	2.73
	Israel – Israël	1	1		
	Japan – Japon	8	3		
	Malaysia – Malaisie	171	77	1	0.58
	Myanmar	33			
	Philippines	6			
	Pakistan	1069		23	2.15
	Republic of Korea – République de Corée	3	3		
	Singapore – Singapour	2	2		
	Thailand – Thaïlande	8			
<b>Total</b>		<b>11 576</b>	<b>299</b>	<b>100</b>	<b>0.86</b>

Region – Région	Country – Pays	Total no. of cases (including imported cases/deaths) – Nombre total de cas (incluant cas importés et décès)	No. of imported cases – Nombre de cas importés	No. of deaths – Nombre de décès	CFR % – TL (%)
<b>Europe</b>	Italy – Italie	1	1		
	United Kingdom – Royaume-Uni	6	6		
	<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>7</b>		
<b>Americas – Amériques</b>	Canada	1	1		
	Chile	2	2		
	Cuba	181			
	Dominican Republic – République Dominicaine	1954		42	2.15
	Haiti – Haïti	58 809		593	1.01
	Mexico – Mexique	187		1	0.53
	United States of America – Etats-Unis d'Amérique	14	12		
	Venezuela (Bolivarian Republic of) – Venezuela (République bolivarienne du)	4	4		
	<b>Total</b>	<b>61 152</b>	<b>19</b>	<b>636</b>	<b>1.04</b>
<b>Oceania – Océanie</b>	Australia – Australie	3	2		
	<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>2</b>		
<b>Grand Total</b>		<b>129 064</b>	<b>325</b>	<b>2 102</b>	<b>1.63</b>



*Matériels et Méthodes*

## Matériel et Méthodes

### I-Matériel

#### II-1-Matériels Utilisés

Etuves à 37°C

Portoirs

Bec Bunsen

Anse de Platine

Pince

Four à Pasteur

Bain Marie

Tubes à essais stériles

Flacons stériles

Distributeurs d'antibiotiques

Lames et Lamelles

Pipettes pasteur

Microscope optique

**I-3-MILIEUX DE CULTURE (Annexe 2)**

- \*Eau Peptonée Hyperalcaline
- \*Gélose Nutritive
- \*Gélose Nutritive Alcaline –GNA
- \*Le milieu TCBS –Thiosulfate Citrate Bile Saccharose
- \*Gélose Mueller-Hinton
- \*Bouillon nutritif
- \*Bouillon Nitraté
- \*Milieu Kligler-Hajna (KIA)
- \*Milieu Mannitol-Mobilité
- \*Milieu Citrate de Simmons
- \*Milieux moëler (Témoin, ODC, LDC, ADH)
- \*Eaux distillée stérile
- \*Milieu Urée –indole
- \*Huile de Vaseline
- \*Huile de paraffine

**II-4-Réactif (annexe 3)**

Réactif de Kovacs

Réactif VP I Alpha naphtol à 6%

Réactif VP II KOH à 40%

Nitrate réductase I acide sulfamilique (en solution à 8<sup>o</sup>/<sub>oo</sub> en acide acétique 5N)

Nitrate réductase II Naphtylamine (en solution à 6<sup>o</sup>/<sub>oo</sub> en acide acétique 5N)

Réactif TDA solution de per chlorure de fer

## II-METHODE

### II-1- Lieu de prélèvement

Les prélèvements ont été faits à partir des eaux usées au niveau de l'Oued Boumerzoug (figure 15) à Chaâbat Erras à Constantine à des périodes différentes.



Figure 15 : Lieu de prélèvement dans l'Oued Boumerzoug

### II-2- Période de prélèvement

Un prélèvement par semaine a été fait durant la période (21/04/2015 au 01/06/2015) avec des échantillons de 200 ml d'eau dans des flacons stérilisés au préalable.

### II-3- Transport des prélèvements

Le transport au laboratoire des échantillons, a été effectué dans une glacière contenant des accumulateurs de glace.

### II-4-Enrichissement, isolement et identification

Les bactéries de genre vibron sont des bactéries rares dans l'environnement et de façon générale leur isolement se passe par un enrichissement afin d'augmenter la probabilité d'existence de la bactérie.

#### II-4-1-Enrichissement

A cet effet comme l'espèce *Vibrio cholerae* est une bactérie halotolérante et alcalinophile, ces caractères ont été utilisés pour la préparation de son milieu d'enrichissement. Des échantillons d'eau de 200 ml ont été enrichis dans de l'eau peptonée alcaline hypersalée (à hauteur de 10% de l'échantillon) pendant 24h à 37 °C.

#### II-4-2-Isolement et identification

##### ❖ Isolement

L'isolement a été effectué sur trois milieux nutritifs gélose nutritive (GN), gélose nutritive alcaline hypersalée (GNA); le milieu au Thiosulfate Citrate Bile Saccharose (TCBS), puis incubés à 37°C pendant 24 heures.

#### ❖ Examen macroscopique

Les colonies suspectes c'est-à-dire des colonies << Smooth >>, lisses, plates, à bords réguliers, 2 à 3 mm de diamètre, faiblement convexe, non irisées en transillumination oblique, brillantes et surtout transparentes sur gélose alcaline ou sous forme de colonies jaune brun de 2 à 3 mm de diamètre sur milieu TCBS ont été identifiées.

#### ❖ Examen microscopique

L'examen microscopique se termine par une coloration de Gram (Annexe 1), montrant les caractères morphologiques (Gram, bacilles fins incurvés)

#### ❖ Identification biochimique

L'identification biochimique en réalité, constitue la grande partie de la recherche. Les parties précédentes étant des manières à améliorer un bon déroulement de cette dernière, elle a été réalisée à partir des cultures pures, une colonie suspecte a été suspendue dans de l'eau distillée stérile dans des conditions aseptiques afin de réaliser une suspension bactérienne.

Avant d'effectuer la galerie Api20E nécessaire pour confirmer l'espèce, nous avons réalisé des tests présomptifs de l'espèce *Vibrio cholerae*.

##### **Recherche d'oxydase :**

Le disque de papier filtre imprégnés de réactif : l'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine, qui est incolore sous forme réduite et rouge-violet sous forme oxydée a été utilisé. Un disque est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile et une parcelle de la culture est déposée à sa surface.

##### **Recherche de catalase :**

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation. Une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes est placée sur une lame et un peu de culture en milieu solide y est répartie : un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase.

##### **Recherche des Décarboxylases : ADH (arginine dihydrolase), LDC (lysine décarboxylase), ODC (Ornithine décarboxylase)**

La suspension bactérienne a étéensemencée sur chacun des trois tubes ; un tube témoin ne contenant aucun des acides aminés n'a aussi étéensemencé. Une condition

anaérobiose a été créée en recouvrant la surface du milieu de paraffine. Tous les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

#### **Test de la Nitrate réductase**

Ce test consiste à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture. On met une ou deux gouttes dans du bouillon nitraté cultivé pendant 24h à 37°C. S'ils sont présents, ils donnent colorée rose en présence d'acide sulfanilique et d' $\alpha$ -Naphtylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de Griess.

#### **Test de Mannitol Mobilité**

On aensemencé à partir d'une culture jeune, par piqûre directe un tube contenant du milieu Mannitol mobilité (gélose mole).

Les colonies isolées sont repiquées sur gélose nutritive, incubées à 37 °C pendant 24h.

#### **❖ Galerie API 20E**

L'identification est ensuite complétée par ensemencement sur galerie API 20E (appareil pratique d'identification) : la galerie API 20<sup>E</sup> comporte 20 microtubes qui contiennent chacun un milieu déshydraté différent.

On prélève une colonie bien isolée sur gélose nutritive et on réalise une suspension homogène dans 5 ml de medium. On inocule la galerie selon la méthodologie recommandée par la notice technique. Les réactions produites pendant la période d'incubation (24h à 48h à une température de 35°C) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. On fait la lecture et on interprète en se référant au catalogue API 20E (annexe 4).



*RESULTATS*

## RESULTATS

### I-Enrichissement :

Après incubation à 37 °c pendant 24H, le milieu EPA a présenté un voile à la surface

### II-Aspects cultureux

#### II-1-Aspect Macroscopique :

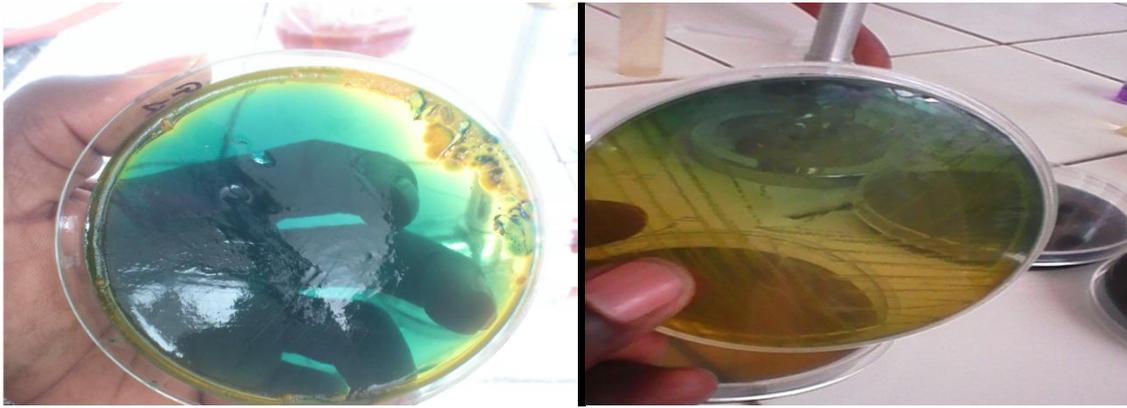
\*Sur GNA, plusieurs colonies de tailles variables entre 1-3 mm de diamètre se sont formées, de couleurs transparentes, laiteuses et blanches présentant des aspects différents.



*Figure 16* : Aspect des colonies sur milieu GNA

\*Sur le milieu TCBS, les colonies présentent les aspects suivants :

- des colonies jaunes plates, de 2 – 3mm de diamètre,
- des colonies jaunes à centre noir de même taille
- des colonies minuscules vertes



**Figure 17** : Aspect des colonies sur milieu TCBS

NB : A partir de chaque colonie présomptive, nous avons réalisé une coloration de Gram et le Test de l'oxydase.

### **II-2-Aspect Microscopique :**

La coloration de Gram révèle de petits bacilles à Gram négatif plus ou moins incurvés.

### **III-Test de l'oxydase :**

Le test positif est révélé par la coloration violette sur le disque d'oxydase.



**Figure 18** : Révélation du Test d'oxydase

NB : Quatre souches ont été retenues.

### **IV-Test de la Catalase :**

Le contact des colonies avec de l'eau oxygénée montre un dégagement gazeux sous forme de bulles.



**Figure 19** : Résultat du Test de catalase

**V-Recherche des Décarboxylases : (ADH, LDC, ODC)**

Le Résultat positif est révélé par le virage au violet des tubes. (Tableau 7)

**Tableau 7** : Résultats du test des Décarboxylases

Souches	ADH	LDC	ODC
Souche B1	-	-	-
Souche 1	+	-	+
Souche 2	+	-	-
Souche 3	+	-	-

**VI-Test de Nitrate Réductase**

Le résultat a donné une coloration rose pour les colonies suspectées.



*Figure 20* : Résultat du test nitrate réductase

### VI-Test Mannitol Mobilité

Le test Mannitol-mobilité a donné des résultats variables.

**Tableau 8** : Résultat du test Mannitol -mobilité

Souches	Résultat
Souche 1	-
Souche 2	+
Souche 3	-
Souche B1	+

### VIII-Identification par Galerie Api20E :

Les résultats obtenus sont les suivants

**Souche 1** : à ADH +, ODC et CIT+, UREE + correspond à *Enterobacter cloacae* selon le catalogue des résultats.



**Figure 21** : galerie Api20E de la souche 1

**Souche 2** : avec un résultat positif à ONPG, ADH, CIT, IND, VP, GEL, MAN, INO, SAC et ARA ; correspond à *Citrobacter freundii*.



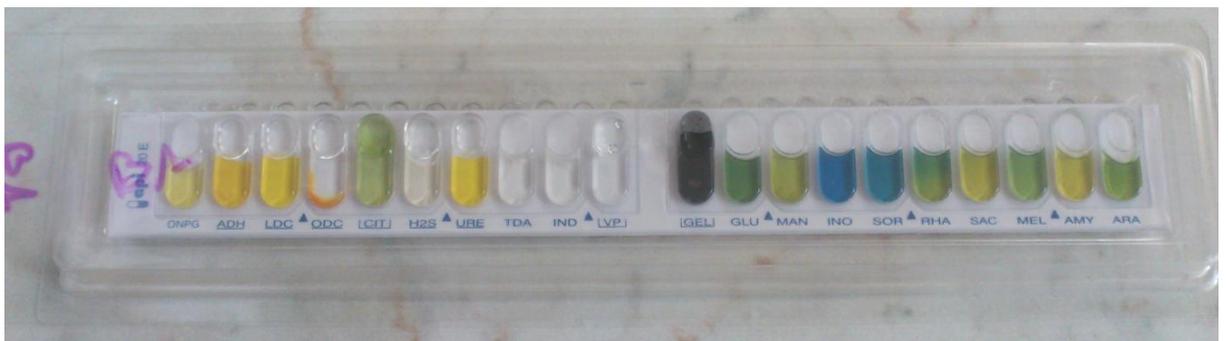
**Figure 22** : Galerie Api20E de la souche2

**Souche3** : avec son caractère visible de bactérie non fermentaire à ADH+, CIT+ correspond à *Pseudomonas spp* dans le catalogue Api20E.



**Figure 23** : Galerie Api20E de la souche 3

**Souche B1** : Seule ADH négatif parmi les quatre souches, elle est de NO<sub>2</sub> +, IND -, CIT - ;  
correspond à *Pasteurella spp*



**Figure 24** : Galerie Api20E de la souche B1



## DISCUSSION ET INTERPRETATION

### Interprétations et Discussion

Sur un total de quatre échantillons prélevés des eaux usées d'Oued Boumerzoug, l'enrichissement a présenté un voile évoquant la bactérie *Vibrio cholerae*.

Le milieu TCBS a présenté une bonne sélectivité que le milieu GNA. Comparativement à la gélose nutritive alcaline, qui a permis à de nombreuses colonies de cultiver. Nous préconisons d'utiliser le milieu TCBS, plus sélectif, pour faciliter la recherche

L'observation microscopique après la coloration Gram et la recherche de l'oxydase sont fondamentales pour orienter l'identification des vibrio.

Les résultats de la catalase et des décarboxylases nous aident dans l'orientation vers le genre *Vibrio*.

Les résultats de l'identification obtenus des quatre souches montrent qu'elles sont des bacilles à Gram négatif, oxydase positive, catalase positive avec des variations quant aux décarboxylases. La nitrate est positive pour toutes les souches par contre le test mannitol mobilité est variable.

Cependant, les vibrio sont ADH, LDC, ODC variables. Ce qui est en accord avec nos résultats.

L'identification sur galerie Api20E a révélé : *Pseudomonas* spp, *Pasteurella* spp, *Enterobacter cloacea* et *Citrobacter freundii*.

Cependant sur les quatre échantillons, on note l'absence de *Vibrio cholerae*. Ce qui pourrait s'expliquer par un certain nombre d'hypothèse.

Une absence effective dans les eaux usées de l'Oued Boumerzoug. L'Oued Boumerzoug se trouve dans une région démographiquement dense. Puisque les eaux usées sont les réservoirs des rejets domestiques, elles peuvent ainsi renseigner sur la persistance d'un germe pathogène causatif d'une maladie diarrhéique dans une population. Par ailleurs les travaux rapportés par GUEGAN [20], qui rapporte que la septième pandémie a épargnée l'Algérie jusqu'en 1971, signalée à Tlemcen. Le choléra existe ainsi dans certaines régions (Nord-Ouest) selon un modèle endémo-épidémique. L'absence du germe pourrait aussi s'expliquer par la mise en

place d'un programme National de Lutte contre le choléra qui aurait permis l'éradication de la maladie dans la population. [50]

Les travaux de Thierry Dutoit [49] rapportent que les eaux usées de l'Oued Boumerzoug, présentent une concentration moyenne en oxygène (4,5 mg /l) et une température moyenne annuelle de 17,4 °C. Ces facteurs physico-chimiques peuvent être un obstacle pour la bonne prolifération des germes. Dans les conditions compétitives et ou défavorables, *vibrio cholerae* peut passer dans un état viable non cultivable. Il se trouve dans l'environnement mais perd la capacité de pousser dans un milieu bactériologique simple.

Les données épidémiologiques rapportées par l'OMS concernant l'absence de cas récents de choléra en Algérie se basent principalement sur les données cliniques. Notre travail est un élément confirmatif des données de l'OMS car il a été rapporté que dans certains pays (cas du Maroc) les données des autorités sanitaires ne sont pas conformes aux données du terrain. [20]

Enfin nous dirons que l'émergence du choléra dans la ville de Constantine est dans une situation contrôlée.



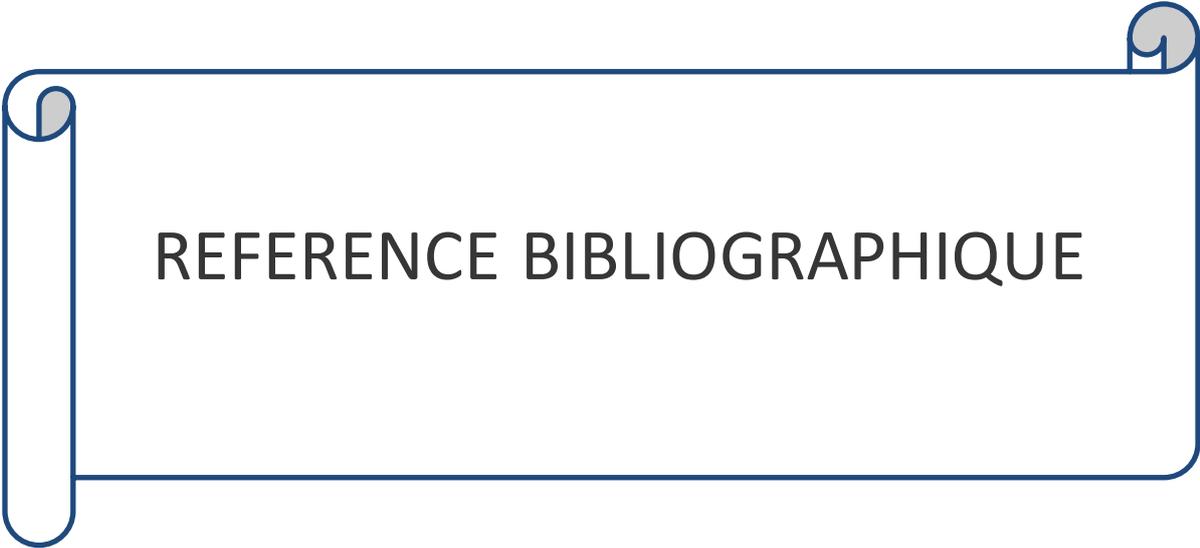
CONCLUSION

### Conclusion

*Vibrio cholerae* est une bactérie d'origine hydrique ayant comme réservoir les eaux polluées environnementales en période inter-épidémique et essentiellement inter-humaine en période épidémique. Fortement contaminatrice des eaux, *Vibrio cholerae* entraîne des maladies diverses dont le choléra, elle est constituée de souches très variées en fonction de leur virulence. La recherche et l'isolement de *Vibrio cholerae* dans les eaux usées constitue une méthode importante de surveillance de l'apparition des souches donc de nouveaux porteurs dans la zone. C'est une première étude qui nous a permis de constater l'absence de cette souche dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug de Constantine (Algérie). Ce qui est en concordance avec le dernier rapport de l'OMS, de plusieurs travaux réalisés en Algérie, et la mise en place d'un programme de lutte contre le choléra.

Nos perspectives seraient :

- D'étaler notre étude sur une large zone (plusieurs sites) pendant une période longue avec plusieurs prélèvements.
- D'étudier d'autres eaux notamment les eaux marines, saumâtres et estuariennes.
- Déterminer les sérotypes
- Déterminer leur antibiorésistance et les comparer avec des souches cliniques isolées dans des pays endémo-épidémique.



REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- [1]- **Laboratoire de microbiologie et d'hygiène des aliments et de l'environnement.** 2007. *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche : risque et prévention N°3p. 4-10, in les technologies de laboratoire. Institut Pasteur Maroc. Département H.I.D.A.O.A., Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II
- [2]-**Don J. Brenner , James T. Staley , David R. Boone , Garrity George , Vos De Paul** .(2005 .Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology,) , The Protéobacterie , 2<sup>ème</sup> Ed, Volume 2, New YORK: SPRINGER-VERLAG ,p. 491-510.
- [3]-**Bertrand, J.-C.** .(2011), Ecologie Microbienne –Microbiologie des Milieux naturels et anthropisés Ed. PUPPA , PAU-France,p. 314-315
- [4]- ]- **Joseph-Pierre Guiraud.**(1998). Microbiologie Alimentaire , DUNOD , Paris,p. 86-87 ;271-274
- [5]-**Brooks G.F.**.(1995) .Medical Microbiology, 20<sup>ème</sup> Ed., Appleton & Lange, CONNECTICUT –USA,p. 224
- [6]-**Wilcoks –C. et Bahr Manson** .(1972).MANSON'S TROPICAL DISEASES, 17<sup>ème</sup> Ed., BALLIERE TINDALI, LONDON,p. 501-504.
- [7]- **François Denis** .(2007). Microbiologie Médical, Elsevier Masson, Camille Desmoulins,p. 323-327
- [8]-[www.microbewiki.kenyon.edu](http://www.microbewiki.kenyon.edu) , 15-04-2015
- [9]-[www.fundacionio.org](http://www.fundacionio.org) , 15-04-2015
- [10]-[www.nature.com](http://www.nature.com), 15-04-2015
- [11].[www.microbes-edu.org](http://www.microbes-edu.org) , 15-04-2015
- [12]-**Quilici Marie-Laure.**(2011).Le Diagnostic Bactériologique su cholera , Revue Francophone des Laboratoires , Institut Pasteur, Paris-France, N°431.
- [13]-**Saha M. Faruque , Albert John M., John J. Mekalanos** , (1998). Epidemiology , Genetics , and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae* . American Society For 8 ,

Microbiology And Molecular Biology , BOSTON-MASSACHUSETT -USA , Vol 62 , N°04 ,p. 1307-1308

[14]-**Comstock E. L. , Maneval David , Panigrahi Pinaki , Aaron Joseph**.(1995) .The Capsule and Oantigenic in *Vibrio cholerae* O139 Bengal Are associated with a Genetic Region Not present in *Vibrio cholerae* O1, American Society For Microbiology, Infection And Immunity, Baltimore-Maryland-USA, Vol 63, N°01 ,p. 317

[15]- **M. Veron**. 1990. Bactériologie médicale. Léon Le Minor 2<sup>e</sup> édition Berger-Levrault, Nancy,p. 480-500.

[16]-**Heidelberg J. F., Jonathan A.Eisen , William C.Nelson , Rebecca A.Clayton Michelle L. Gwin** , .(2000) .DNA Sequence of both chromosomes of *Vibrio cholerae* pathogen *Vibrio cholerae*., Macmillan Magazines, Vol406, London –UK,p. 377-378

[17]-**Shakibaie Mr.** , Principe Of Basic Molecular Bacteriology , University of Medical Sciences , KERMAN-IRAN ,p. 1-3

[18]-**Denis F. , Marie –Cecile Ploy , Christian Edouard Bingen , Roland Quentin**.(2007) .Bacteriologie Medicale-techniques usuelles Elsevier Masson, Issy-Les-Moulineaux-France ,p. 324-327

[19]-**Nair G.B. et Bartram J.** .(2001 . *Vibrio cholerae* .).National Institute of cholera and Enteric Diseases, Calcuta –India ,p. 119-122

[20]-**Guegan Jean François** .(2003-2006) .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. 2-13

[21]- **Labeuche Yannick** .(2006).Caractérisation de la Virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huitre *Crassostrea gigas* , Thèse de doctorat , Université de BREST , Brétagne Occidentale –France ,p. 12

[22]-**Dalsgaard A. , Forslund A. , Hesselberg A. , Bruun B.** .(200), .Clinical manifestation and Characterization of extra-intestinal *Vibrio cholerae* non O-1 , non O-139 infections in DANMARK , European Society of clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vol 6, N°11

- [23]-**Dibinost C., Saka H.A , Aliandro O., Sola C., Panzetta-Duttari G., Carranzap., Echenique J., Patrilo E., Bocco J.L.**(2004).Virulence factors of non-O1 non O-139 *Vibrio cholerae* in Córdoba, Revista Argentina de Microbiologia , Argentina ,p. 162-163
- [24]-**Nicholas A. Daniels , Alireza Shafaie .** (2000).A Review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians, Cliggott, San-Francisco-USA,p. 2-3
- [25]-**Kenneth Peterson .**(2002) .Expression of *Vibrio cholerae* Virulence Genes in Response to Environmental Signals , Current Research and Future Trends , vol.3,p. 30-32
- [26]-**Kaper J.B and Trucksis M.** (1994) .Toxins of *Vibrio cholerae* .In Waschmuth , I.K., Blake ,p. A and Olsvik, O (eds) *Vibrio cholerae* and cholera :molecular to global perspectives.Washington DC, Press ,p. 145-176
- [27]-**Ramdani Bouguessa .**(2011).Manuel de Microbiologie , Office des Publications Universitaires , 3eme ed., Alger,p. 119-124
- [28]-**Henri Leclerc ,** (1995).Microbiologie Générale –La bactérie et Le monde Bactérien, Edition DOIN, France ,p. 504-506
- [29 ]-**Waldor MK, Mekalanos J.J.**(1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin, Science, Vol.272 ,p. 1910-4.
- [ 30]- **Huq A, Colwell RR, Chowdhury MA,** (1995). Coexistence of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in plankton in Bangladesh , Lancet ; Vol.345 ,p. 1249.
- [31]-**Maya K.. Sarah T. Miyata , Daniel Unterweger , Pukatzi .Stefan.**(2011).Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae* , Journal of Medical Microbiology , vol.60 ,p. 398-403
- [ 32-**Foster, J. S.**(2000).*Vibrio fischeri* lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the Euprymna scolopes symbiotic light organ , Developpement of Biology, Vol. 226,p. 242-254
- [ 33 -**Lauriano, C. M.** (2004).The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae* , Journal of Bacteriology , Vol.186,p. 4864-4874

- [ 34 ]- **Fournier JM et Quilici ML.**(2002). Infections à vibrions non cholériques. Encyclopédie Médicale Chir, Ed. Scientific Médical Elsevier, Paris, Maladies infectieuses, ;p. 7
- [ 35 ]- **Comstock, L. E.; Johnson, J. A.; Michalski, J. M.; Morris, J. G. & Kaper .**(1996).Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1 , *Molecular Microbiology*, Vol. 19,p. 815-826
- [ 36 ]- **Faruque, S. M. et Mekalanos, J. J.** (2003) Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution *Trends Microbiol*, Vol.11,p. 505-510
- [ 37 ]- **Kovach, M. E.; Shaffer, M. D. et Peterson, K. M.** , (1996). A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae* , *Microbiology*, Vol.142,p. 2165-2174
- [38 ]- **Tacket, C. O.; Taylor, R. K.; Losonsky, G.; Lim, Y.; Nataro, J.p. ; Kaper, J. B. et Levine.** (1998).Investigation of the roles of Toxin-Coregulated Pili and Mannose-Sensitive Hemagglutinin Pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection , *Infection Immunology* , Vol.66,p. 692-695
- [ 39 ]- **Campos, J.; Martinez, E.; Marrero, K.; Silva, Y.; Rodriguez, B. L.; Suzarte, E.; Ledon, T. et Fando.**(2003).Novel type of specialized transduction for CTXphi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJphi in *Vibrio cholerae* , *Journal of Bacteriology* , Vol.185,p. 7231-7240
- [40 ]- **Groisman, E.; Sturmoski, M.; Solomon, F.; Lin, R. et Ochman, H.** (1999).Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage , *PNAS*, Vol.96,p. 1071-1076
- [ 41 ]- **Ichinose, Y.; Yamamoto, K.; Nakasone, N.; Tanabe, M. J.; Takeda, T.; Miwatani, T. et Iwanaga .**(1987).Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae* , *Infectieuse Immunology*, Vol. 55,p. 1090-1093
- [42]-**Traore Sylvain Gnamien.** (2012-2013).Risques de Contraction Des Affections à *Vibrio* SP et à *Paragonimus* SP liés à la consommation des Crabes et des Crevettes vendus sur les marchés d'Abidjan et de DABOU, Thèse de doctorat , Université Nangui Abrogoua,p. 25-28

- [43]-**Jean –Michel Fournier et Marie-Laure QUILICI.**(2007).Choléra , Elsevier Masson , Vol.36 ,p. 730-732
- [44]-**Morillon M. et Garnotel E.** (2004).Choléra , Maladies Infectieuses , Elsevier , vol.1 ,p. 70
- [45]-**Amit Ghosh et T.Ramamurthy.** (2010).Antimicrobials & cholera :are we stranded ? , National Institute of cholera & Enteric Diseases , Indian J ournMed Res , Vol.133 ,p. 226-228
- [46]-**Organisation Mondiale de la Santé (OMS)** , (2010). Element d'épidémiologie , 2eme Edition ,p. 1
- [47]-**Organisation Mondiale de la Santé (OMS)** , .(2014). Choléra , 2013 .Relevé épidémiologique hebdomadaire , N°31, Vol.89,p. 345-348
- [48]-**Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales** , (2012).Maladies Infectieuses Tropicales , Editions Alinéa Plus ,p. 514-5016
- [49]-**Selima Berchi , Amel Ouati Kamel Louadi** , .(2012),. Typologie des gîtes propices au développement larvaire de *Culex pipiens* L.1758 (Diptera-Culicidae) source de nuisance à Constantine (Algérie), In : .(2012) .Thiery Dutoit , ecologia mediterranea , Revue internationale d'écologie méditerranéenne , Vol.38 ,p. 8 -12
- [50]-**Laïd Y. , Atek M. et Ouchfoun A.** , (1999).Impact de l'environnement sur la situation des maladies transmissibles par voie Hydrique (MTH) en Algérie In : Reflet de la situation épidémiologique , 10 ans déjà ! pp.72-76.Ministère de la santé et de la population , Institut National de Santé Publique , Alger.



ANNEXES

## ANNEXE 1 : COLORATION DE GRAM

### 1. Prélèvement :

- A partir d'une culture liquide : prélever un aliquote de suspension à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisé le milieu
- A partir d'un milieu solide : réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile)
- A partir de produits alimentaires ou biologiques : prélever un aliquote du produit (dilué ou non) à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisé le milieu

### 2. Réalisation du frottis:

Etaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame .

Le frottis réalisé doit être :

- MINCE et HOMOGENE, étendu sur la lame sans toucher les bords
- Réalisé sur une lame PROPRE et DEGRAISSEE, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.

### 3. Séchage :

- à la température du laboratoire, si possible
- ou bien à **chaleur douce** : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante. NE JAMAIS CHAUFFER BRUTALEMENT

### 4. Fixation :

**But** : tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame.

#### • Fixation par la chaleur :

- à utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de **cultures bactériennes**
- passer la lame **-frottis situé sur le dessus-** dans la flamme chauffante, LENTEMENT et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir.

- Fixation par l'alcool : employé **quel que soit le produit traité**.

- recouvrir la lame pendant 5 min avec de l'alcool puis rincer à l'eau déminéralisé et égoutter le frottis avant coloration.

### 5. Coloration :

**Principe** : La coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – grâce à leurs différences de nature de paroi.

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
<b>COLORATION PRIMAIRE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recouvrir la lame de <b>crystal violet ou violet de gentiane</b></li> <li>- Rincer à l'eau distillée et récupérer le cristal violet dans un bûcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration)</li> </ul>	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
<b>MORDANÇAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recouvrir de <b>Lugol</b></li> <li>- Rincer à l'eau distillée et l'égoutter</li> </ul>	1 minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
<b>DECOLORATION</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tenir la lame inclinée et faire couler pendant <u>quelques secondes</u> de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore.</li> <li>- Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter</li> </ul>	5 secondes environ	<p>L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores.</p> <p>Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.</p>
<b>COLORATION SECONDAIRE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recouvrir la lame de <b>fuschine</b></li> <li>- Rincer à l'eau distillée</li> </ul>	1 minute	La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram – ou négatif.
<b>SECHAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher</li> </ul>		

## ANNEXE 2 : Milieux de Culture

### Milieu Eau peptonée hypersalée alcaline

Peptone .....	30 g/l
NaCl .....	30 g/l

Ajuster le pH à  $8,4 \pm 0,2$  (à 25 °C) avec une solution d'hydroxyde

### Milieu GELOSE NUTRITIVE

extrait de viande .....	1,0 g/l
extrait de levure .....	2.5 g/l
peptone .....	5,0 g/l
chlorure de sodium .....	5,0 g/l
Agar .....	15,0 g/l
pH .....	7,0

### Milieu Gélose nutritive alcaline

Peptone .....	20 g/l
Agar .....	15 g/l
Chlorure de sodium .....	5 g/l

Ajuster le pH à  $8,2 \pm 0,2$  (à 25 °C) avec une solution d'hydroxyde de sodium.

**Milieu thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS)**

Peptone .....	10 g/l
Extrait de levure .....	5 g/l
Citrate de sodium .....	10 g/l
Thiosulfate de sodium .....	10 g/l
Chlorure de sodium .....	10 g/l
Bile de bœuf .....	8 g/l
Citrate ferrique .....	1 g/l
Saccharose .....	20 g/l
Bleu de bromothymol .....	0,04 g/l
Bleu de thymol .....	0,04 g/l
Agar .....	14 g/l

Contrôler le pH qui doit être à  $8,6 \pm 0,2$  (à  $25\text{ °C} \pm 2$ )

**Milieu Mannitol-Mobilité**

Peptone .....	20 g/l
Nitrate de Potassium .....	1 g/l
Mannitol .....	2 g/l
Rouge de Phénol à 1% .....	4ml
Agar .....	4 g/l

pH=8,1

**Milieu Citrate de Simmons**

Sulfate de Magnésium .....	0,2 g/l
Phosphate monoammoniaque, .....	1 g/l
Phosphate dipotassique .....	1g/l
Citrate de Sodium .....	2 g/l
NaCl .....	5 g/l

Bleu de bromothymol ..... 80 mg/l

Agar ..... 12 g/l

pH=6,8

### Milieu Urée-indole

L-tryptophane ..... 3 g/l

Phosphate monopotassique ..... 1 g/l

Phosphate bipotassique ..... 1 g/l

NaCl ..... 5 g/l

Urée ..... 20 g/l

Alcool 95° ..... 10 ml

Rouge de phénol ..... 25 ml

pH=6,7

### Milieu Moëller

Peptone ..... 5 g/l

Extrait de Viande ..... 5 g/l

Pourpre de bromocrésol ..... 0,1mg/l

Pyridoxal ..... 5 mg/l

Glucose ..... 0,5 g/l

pH=6

### Milieu Mannitol-mobilité

hydrolysate tryptique de caséine:.....10,0 g/l

mannitol:.....7,5 g/l

rouge de phénol:.....0,4 mg/l

nitrate de potassium:.....1,0 g/l

agar:.....3,5 g/l

pH = 7,6

**Bouillon Nitraté**

Infusion cœur-cervelle..... 25,0 g/l  
- Nitrate de sodium.....10,0 g/l

pH = 7,2

### ANNEXE 3 : REACTIFS UTILISES

#### Réactif de la recherche de l'oxydase

Disques imprégnés d'une solution à 1% de chlorhydrate de  
Tétraméthylparaphénylènediamine.

#### Réactif de Kovacs

-P-dimethyl aminobenzaldéhyde ..... 7g/l  
-Alcool amylique ..... 75 ml  
-Acide chlorhydrique concentré ..... 20 ml

#### Réactif de Voges-Proskauer

##### VP I

- Hydroxyde de Potassium ..... 40 g/l  
-Eau..... 100 ml

##### VP II

- $\alpha$ -naphтол ..... 6 g/l  
-Ethanol ..... 100 ml

#### Réactif TDA

-Perchlorure de fer ..... 3,4 g/l  
-Eau distillée stérile ..... 100 ml

#### Réactif pour la recherche de la Nitrate réductase (NR)

##### Réactif I

-Acide sulfamilique ..... 0,8 g/l  
-Acide Acétique 5N ..... 100 ml

**Réactif II**

-Naphtylamine..... 0,5 g/l

-Acide acétique 5N .....100 ml

**Solution de l'eau oxygénée à 10 % :**

-Eau oxygénée à 110 V .....0,5ml

-Eau distillée..... 14,5 ml

**ANNEXE 4 : Tableau d'identification de la galerie Api20E****TABLEAU DES RÉSULTATS – INCUBATION DE 18 À 24 HEURES**

TUBE	RÉACTIONS		COMMENTAIRES
	POSITIVE	NÉGATIVE	
ONPG	Jaune	Incolore	Une teinte jaune pâle est souvent obtenue, la considérer comme une réaction négative.
ADH	Rouge ou orange	Jaune	
LDC	Rouge ou orange	Jaune	
ODC	Rouge ou orange	Jaune	
CIT	Turquoise ou bleu foncé	Vert pâle ou jaune	La lecture se fait dans la partie supérieure de la cupule (en aérobie).
H <sub>2</sub> S	Dépôt noir	Aucun dépôt noir	
URE	Rouge ou orange	Jaune	
TDA	Brun-rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte de chlorure de fer à 10%. Lire immédiatement la réaction.
IND	Anneau rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte du réactif de James. Lire la réaction immédiatement.
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore ou rose pâle	Ajouter 1 goutte de KOH à 40% puis 1 goutte d'alpha-naphthol à 6%. Lire la réaction après 10 minutes.
GEL	Diffusion du pigment	Aucune diffusion, incolore	La répartition des particules solides à travers la cupule doit être considérée comme une réaction négative.
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu ou bleu-vert	La fermentation des sucres commence dans la partie la plus anaérobie du microtube (partie inférieure). Il faut lire ces réactions à partir de la base de la cupule vers le haut. Une couleur jaune au fond indique une réaction positive.

## Recherche et Etude de *Vibrio cholerae* dans les eaux usées de l'Oued Boumerzoug

*Mémoire en vue de l'obtention du diplôme :  
Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*

### *Résumé*

Les eaux usées constituent un milieu aquatique rassemblant l'essentiel des rejets domestiques. Les eaux usées constituent donc un réservoir important pour la prolifération des microorganismes. Sa constitution en microorganismes pathogènes peut renseigner sur la persistance de ces derniers dans la population.

*Vibrio cholerae* est une bactérie aquatique pathogène pouvant être retrouvé au niveau des eaux usées. Responsable du choléra, maladie pandémique, *Vibrio cholerae* peut persister dans l'environnement aquatique. Dans les conditions favorables, elle pourra déclencher une épidémie.

Notre travail s'inscrit dans la recherche de la bactérie dans les eaux usées de l'Oued Boumerzoug, les résultats nous renseigneront de l'état de la bactérie dans les eaux usées de l'Oued.

La bactérie a ainsi été recherchée selon la méthode conventionnelle de la recherche de *Vibrio cholerae* dans un laboratoire de bactériologie.

Nos résultats rapportent une absence de la bactérie dans les prélèvements effectués.

Ce résultat a ainsi été en concordance avec les travaux déjà réalisés qui stipule que les caractéristiques climatiques et géographique d'Oued Boumerzoug ne favorisent pas la survie de *Vibrio cholerae*.

Ainsi, les données de l'OMS concernant l'absence des cas de choléra en Algérie (donc absence de cas à Constantine) peuvent être affirmés.

### *Mots clés :*

*Vibrio cholerae*, choléra, Oued Boumerzoug, Eaux Usées, Isolement

*Année Universitaire : 2014-2015*